

Abschätzung der mikrobiellen Diversität in anoxisch sauren Sedimenten von Braunkohle-Restseen unter Berücksichtigung des Eisenschwefelkreislaufs

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth

Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie (ÖMIK) am Bayreuther Institut für terrestrische Ökologie (BITÖK)

von

Marco Blöthe

aus Oyten, Niedersachsen

Bayreuth, im September 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2000 bis Oktober 2003 am Lehrstuhl für Hydrologie unter Leitung von Prof. Dr. K. Küsel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Promotionsgesuch eingereicht am 14.08.2004

Wissenschaftliches Kolloquium am 08.07.2005

1. Gutachter Professor Prof. Dr. Küsel Küsel
2. Gutachter Professor Prof. Dr. Stefan Peifer

Amtierender Dekan: Professor Dr. Ortwin Meyer

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Personen namentlich nennen, die wissend oder unwissentlich einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Kirsten Küsel für die Themenstellung und für die Betreuung meiner Arbeit am BITÖK in Bayreuth. Das gleiche gilt für Herrn Prof. Dr. Harold Drake. Sie haben mir mit der Möglichkeit, ein interessantes Thema zu bearbeiten, auch den Einblick in eine interessante Arbeitsgruppe ermöglicht.

Für das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei den Mitarbeitern des ÖMIK bedanken. Herr Dr. Andreas Schramm, Marcus Horn und Achim Schmalenberger standen mir bei Problemen hilfreich zur Seite; besonders wenn die **AR**beit ausuferte. Für die unvermeidlichen und selbstverschuldeten alltäglichen Laborprobleme, von denen die letzteren oftmals das größte Hindernis darstellten, gab es da immer Ralf Mertel, Daria Schulz oder Anita Gössner. Besonders auf Katrin Walther war im Labor nicht zu verzichten. Nicht zu vergessen ist natürlich auch Melanie Vetter.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Stefan Peiffer. Seine Einwende und Anmerkungen in den Arbeitsgruppensitzungen waren stets eine Quelle für neue Aspekte, Fragen und Standpunkte. Ein herzliches Dankeschön geht an "meinen Winne" (Dr. Winfrid Gade). Er hat mich nicht nur bei den Probenahmefahrten tatkräftig unterstützt, ohne ihn wären die Probenahmen gar nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Alexander Loy von der Abteilung für mikrobielle Ökologie an der Universität Wien danke ich für die Durchführung der PhyloChip-Analyse; Frau Dr. Elke Zwirnmann von der Limnologischen Station in Potsdam für die Analyse der Huminstoffe.

Besonders am Herzen liegt es mir, an dieser Stelle meinen Eltern und meinen Brüdern zu danken; vor allem meinem Zwillingsbruder Thomas. Er hat mich in schwierigen Zeiten aufgenommen und seinen letzten Tee mit mir geteilt.

Nicht zuletzt danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die dreijährige Finanzierung des Forschungsprojektes DFG-Ku 1367/1-2, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Schlussendlich möchte ich mich bei Verena Gerken bedanken. Sie hat sich nicht nur um die Durchsicht des Manuskripts gekümmert, sondern auch in schwierigen Situationen die Ruhe bewahrt.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis	IX
IV.	Abkürzungsverzeichnis	XI
V.	Zusammenfassung	XIII
VI.	Summary	XV
1	Einleitung	1
1.1	Zusammensetzung von Biozönosen	1
1.2	Diversität	2
1.3	Diversitätserfassung mikrobieller Biozönosen	2
1.4	Mikrobielle Diversität extremer Ökosysteme	4
1.5	Die Entstehung saurer Tagebau-Restseen in der Niederlausitz	5
1.6	Charakterisierung von Restsee 77 in der Niederlausitz	7
1.7	Reduktive Prozesse im Sediment von See 77	8
1.7.1	Fe(III)-Reduktion	8
1.7.2	Sulfatreduktion	10
1.8	Die Kopplung von Eisen- und Schwefelkreislauf im Sediment	11
1.9	Zielsetzung	13
1.9.1	Hypothetisches Modell zum Fe-S-Kreislauf im Sediment von Restsee 77	13
2	Material und Methoden	17
2.1	Lage des Untersuchungsgebietes	17
2.2	Allgemeine Methoden	17
2.2.1	Probennahme	17
2.2.2	Aufbereitung der gezogenen Sedimentkerne	18
2.2.3	Extraktion von Huminstoffen aus Zone I und Zone III in Restsee 77	19
2.2.4	Herstellung steriler Stammlösungen	20
2.2.5	Kolorimetrische Quantifizierung unterschiedlicher Eisen- und Schwefel-spezies	20
2.2.5.1	Bestimmung der Fe(II)-Freisetzung	21
2.2.5.2	Bestimmung von unterschiedlichen Schwefelverbindungen	21
2.2.6	pH-Messung	24
2.2.7	Bestimmung von Organischen Verbindungen mittels HPLC	24
2.2.8	Statistische Methoden	25
2.2.9	Rarefaction-Analyse	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	DNA-Extraktion aus dem Sediment	26
2.3.2	PCR-Amplifikation der 16S rDNA.	26
2.3.3	Klonierung	27

2.3.4	Bestimmung der Zellzahl im Sediment mittels DAPI-Färbung und „Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung“ (FISH)	27
2.3.4.1	Fixierung der Zellen	27
2.3.4.2	DAPI-Färbung	29
2.3.4.3	FISH	29
2.3.5	DGGE- <i>fingerprinting</i>	29
2.3.6	'Verdünnungs-PCR'	30
2.3.7	Erstellung einer allgemeinen Klonbibliothek mit universellen Bakterien-Primern	30
2.3.8	Erstellung einer Klonbibliothek mit spezifischen Primern für Fe(III)-Reduzierern	31
2.3.9	Klonbibliotheken und Sequenzanalyse	31
2.3.10	PhyloChip-Analyse	32
2.4	Kultivierungsabhängige Untersuchungen	32
2.4.1	Herstellung verschiedener Fe(III)-Festphasen und des löslichen Fe(III)	32
2.4.2	Flüssigmedien für MPN-Studien, Anreicherungs- und Reinkultur-Experimente	33
2.4.2.1	Fe(III)-Pyrophosphat-Medium (FePP _i -Medium)	34
2.4.2.2	FeCitrat-Medium	34
2.4.3	Festmedien für Anreicherungskulturen und Tiefagar-Verdünnungsreihen	35
2.4.4	Mikrokosmenexperimente	35
2.4.5	MPN-Ansätze	36
2.4.6	Experimente mit den Reinkulturen von <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 583 und <i>Acidobacterium capsulatum</i> DSM 11244	36
2.4.7	Anreicherungskulturen	37
2.4.8	Untersuchungen zum Schwefelumsatz in den Anreicherungskulturen	37
2.4.9	Untersuchungen zum Einfluss von Huminstoffen auf die Fe(III)-Reduktion	38
2.5	Chemikalien und Gase	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Beschreibung der Sedimentfestphase von Restsee 77	39
3.2	Fe(II) _{ges.} -Freisetzung im Sediment	40
3.3	Effekt unterschiedlicher pH-Werte auf die Fe(II) _{ges.} -Freisetzung in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III des Sediments	41
3.4	Tiefenprofil von Fe(II) _{ges.} , Sulfat, pH und der Abundanz von Mikroorganismen im Sediment	43
3.5	Allgemeine Diversität der Bakterien	44
3.5.1	DGGE- <i>fingerprint</i> aus Zone I, II und III	44
3.5.2	DGGE-Klonbibliothek aus Zone I und Zone III	45
3.5.3	Allgemeine Klonbibliothek aus Zone I und Zone III	47
3.5.4	Rarefaction-Analyse der erstellten DGGE- und allgemeinen Klonbibliotheken	50
3.6	Analyse der SRB-Diversität mittels PhyloChip in den Zonen I, II und III	51
3.7	Einfluss des pH auf die Reduktion von Fe(III) ₂ (SO ₄) ₃ durch <i>A. ferrooxidans</i> unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM S ⁰ als Elektronendonator	55
3.8	Einfluss des pH auf die Reduktion von unterschiedlichen Fe(III)-Oxide durch <i>A. ferrooxidans</i> unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM S ⁰ als Elektronen-donor	56

3.9	Reduktion von löslichen Fe(III)-Verbindungen und Fe(III)-Oxiden durch <i>A. capsulatum</i> unter anoxischen Bedingungen	59
3.10	Nachweis der 16S rDNA von azidophilen und neutrophilen Fe(III)-Reduzierern und von Acidobakterien über eine 'Verdünnungs-PCR'.	63
3.11	Klonierung, RFLP-Screening und phylogenetische Analyse der mit den spezifischen Primern für Fe(III)-Reduzierer erhaltenen PCR-Produkte	64
3.11.1	Phylogenetische Analyse der erhaltenen <i>Acidiphilium</i> -Klonsequenzen	64
3.11.2	Phylogenetische Analyse der erhaltenen 'Bioleaching'-Klonsequenzen	65
3.11.3	Phylogenetische Analyse der erhaltenen <i>Geobacter</i> -Klonsequenzen	65
3.11.4	Phylogenetische Analyse der <i>Geothrix</i> - und <i>Shewanella</i> -Klonsequenzen	68
3.11.5	Bestimmung der Acidobakterien im Sediment von Restsee 77	68
3.12	Analyse der aus Zone I und Zone III extrahierten Huminstoff-Lösung	70
3.13	Stimulierung der Fe(II) _{ges.} -Freisetzung in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III durch Zugabe einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III bei unterschiedlichen pH-Werten	71
3.14	Anreicherungskulturen MB _{HZIII} und MB _{HZIV}	74
3.15	Verwendung des Kohlenstoffs von Dichtefractionen aus den Restseen 77 und 116 als Substrat für die Fe(III)-Reduktion	77
3.16	Chemische Umsetzung von zugegebenem Na ₂ S zu Sedimentproben und Eisenfestphasen	79
3.17	Zeitlicher Verlauf der Fe- und S-Spezies während einer stimulierten Sulfatreduktion mit Acetat in Zone III	82
3.18	Effekt von elementarem Schwefel auf die Reduktion von Fe(III) in Zone I und Zone III	86
3.19	Anreicherungskultur MB1 und MB2 mit Sulfid (5 mM) und Schwert-mannit _{autokl.} (40 mM) bei pH 3 und pH 5	88
3.19.1	Fe(II) _{ges.} -Freisetzungsrates in den Folgetransfers von MB1 und MB2 mit Na ₂ S	89
3.19.2	Phylogenetische Analyse der Anreicherungskultur MB2	92
3.20	Anreicherungskultur MB1 und MB2 mit Thiosulfat (10 mM) und Fe(OH) ₃ (40 mM) bei pH 5	92
3.21	Versuch der Gewinnung von Reinkulturen aus den Anreicherungskulturen MB1 und MB2	93
3.22	Kopplung der Oxidation von S-Verbindungen an die Fe(III)-Reduktion in Anreicherungskultur MB2 bei pH 3 und pH 5	94
3.23	Anreicherungskultur MB3	97
3.24	Isolierung von MB3	98
3.25	Zeitlicher Verlauf der Schwefel- und Thiosulfat-Disproportionierung durch Isolat MB3 mit 5 mM Sulfid und 10 mM Thiosulfat bei pH 5,5	101
4	Diskussion	104
4.1	Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77	104
4.1.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment	105
4.2	Einfluss der geochemischen Parameter auf die Mikrobiota	106
4.2.1	Azidophile Fe(III)-Reduzierer	107

4.2.1.1	Acidobacteria	109
4.2.2	Neutrophile Fe(III)-Reduzierer	110
4.2.3	Sulfatreduzierende Bakterien	111
4.2.4	Einfluss molekularbiologischer Methoden auf die Ergebnisse bei Diversitäts- untersuchungen	113
4.3	Mikrobielle Fe(III)-Reduktion durch azidophile Bakterien	114
4.3.1	Einfluss von pH und Fe(III)-Form auf die Fe(III)-Reduktion	114
4.3.2	Limitierung der Fe(III)-Reduktion	116
4.4	Huminstoffe als Elektronendonator für die reduktiven Prozesse im Sediment	116
4.5	Kopplung des Schwefels und Eisenkreislaufs im Sediment	118
4.6	Kopplung des Schwefelkreislaufs an den Eisenkreislauf	120
5	Literatur	123
6	Anhang	137
6.1	Dichtefraktionierung	137
6.2	Analyse der Huminstoff-Lösungen	137
6.2.1	Fraktion 1: Huminstoffe (HS)	137
6.2.2	Fraktion 2: HS-Hydrolysate (Building Blocks)	139
6.2.3	Fraktion 3: Niedermolekulare Säuren	139
6.2.4	Fraktion 4: Neutral-amphiphile Fraktion	139
6.2.5	Fraktion 5: Polysaccharide (EPS = Extrazelluläre polymere Substanz)	139
6.2.6	Fraktion 6: Anorganische Kolloide	139
6.2.7	Fraktion 7: Natürliche Hydrophobe Stoffe (HOC)	140

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der an der Fe(III)-Reduktion beteiligten mikrobiellen Prozesse. ① autotrophe Fe(III)-Reduzierer: z.B. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; ② heterotrophe Fe(III)-Reduzierer: z.B. *Geobacter metallireducens*; ③ fermentierende Bakterien; ④ sulfatreduzierende Bakterien; ⑤ chemische Reaktion von Sulfid mit Fe(III)-Mineralen; ⑥ Sulfatreduktion; ⑦ Disproportionierung reduzierter Schwefelverbindungen mit nachfolgender chemischer Reduktion von Fe(III) durch Sulfid: z.B. *Desulfocapsa sulfoexigens*. 10
- Abbildung 1.2 Hypothetisches Modell zum Fe-S-Kreislauf im Sediment von Restsee 77.. 14
- Abbildung 2.1 Lage des untersuchten Restsee 77 und der Restseenkette in der Nähe von Lauchhammer, Lausitz (verändert nach PEINE 1998). 17
- Abbildung 2.2 Einzelne Sedimentkerne aus Restsee 77 mit der gut zu erkennenden Schichtung des Sediments. 18
- Abbildung 3.1 Fe(II)_{ges.}-Freisetzung (○) in Mikrokosmen aus Zone I (A) und Zone III (B) des Sediments von Restsee 77. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus jeweils drei Parallelansätzen. 41
- Abbildung 3.2 Effekt des pH-Wertes auf die Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (A) und Zone III (B) des Sediments von Restsee 77. Die ausgefüllten Symbole stellen die Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in der jeweiligen Zone beim Original-pH dar. Die offenen Symbole stellen die Fe(II)_{ges.}-Freisetzung unter geänderten pH-Bedingungen dar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen mit der Standardabweichung. .. 42
- Abbildung 3.3 Verlauf von Fe(II)_{ges.} (○), Sulfat (■), pH (▲) und Zellen/ml (+) mit zunehmender Sedimenttiefe im Restsee 77. Bei den dargestellten Werten für Fe(II)_{ges.}, Sulfat und pH handelt es sich jeweils um eine Einzelbestimmung. Bei den Werten für Zellen/ml handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung. 43
- Abbildung 3.4 DGGE-*fingerprint* aus Zone I (0-7,5 cm), Zone II (7,5-10,5 cm) und Zone III (10,5-16 cm). Beim Marker handelt es sich um einen Mix aus 16S rDNA-Amplifikaten mit dem Primer-Set GM5-Clamp/907RM von den Reinkulturen *E. coli*, *A. capsulatum* und *A. ferrooxidans*. 45
- Abbildung 3.5 Zugehörigkeit der erhaltenen Klonsequenzen in Klonbibliotheken aus Zone I und Zone III zu den phylogenetischen Großgruppen. 48
- Abbildung 3.6 Phylogenetische Verwandtschaft der Klone aus Zone I und Zone III aus der Gruppe der *Acidobacteria*. (rot) allgemeinen Klonbibliothek; (blau) Klonbibliothek aus der Verdünnungs-PCR; (grün) DGGE-Klonbibliothek. 49
- Abbildung 3.7 Rarefaction-Analyse der allgemeinen Klonbibliotheken (A) und der DGGE-Klonbibliotheken (B) aus den Sedimentzonen I und III. Die Abschätzung der voraussichtlichen Anzahl an OTU's oder RFLP-Mustern [$E_{(Sn)}$] wurde aus der Anzahl der analysierten Klone durch RFLP-Muster oder DGGE-Gel berechnet. Die rot dargestellten Kurven geben den theoretischen Verlauf für $E_{(S)}$ wider, wenn weitere Klone untersucht worden wären. 51
- Abbildung 3.8 Ergebnisse der PhyloChip-Untersuchung zur Diversität der SRB's. (A) Verwendeter SRB-PhyloChip zur Erfassung der Diversität der sulfatreduzierenden Bakterien in den Zone I, II und III im Sediment von Restsee 77. Auf dem Microarray wurden die Sonden in drei Parallelen aufgebracht. Sonden mit einem Signal-Rausch-Verhältniss ≥ 2 wurden als positiv gewertet und sind in der Abbildung durch drei Punkte

dargestellt. Die unter (B) dargestellten Sonden stellen die als positiv bewerteten Sonden und ihre Gruppenspezifität dar.....	53
Abbildung 3.9 Einfluss des pH auf die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus löslichem $\text{Fe(III)}_2(\text{SO}_4)_3$ durch <i>A. ferrooxidans</i> mit elementarem Schwefel (10 mM) als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen bei 30°C und den pH-Werten 1,8 (●), 2,0 (◆), 2,7 (△) und 3,1 (□). Als Kontrolle (▼) diente ein nicht inokulierter Ansatz.....	56
Abbildung 3.10 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit _{autokl.} (●), Fe(OH)_3 (□) und Goethit (▲) durch <i>A. ferrooxidans</i> mit elementarem Schwefel als Elektronendonator bei 30°C und pH 3 (A), pH 4 (B) und pH 5 (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Parallelansätzen.....	57
Abbildung 3.11 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit _{sterilf.} (A) und Schwertmannit _{autokl.} (B) bei pH 3 (●), 4 (○) und 5 (■) durch <i>A. ferrooxidans</i> mit elementarem Schwefel (10 mM) unter anaeroben Bedingungen bei 30°C. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Parallelansätzen.	58
Abbildung 3.12 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus unterschiedlichen Fe(III) -Quellen bei pH 3 und 5 unter anoxischen Bedingungen durch <i>A. capsulatum</i> bei 30°C mit Glukose (2 mM) als Elektronendonator. (A) □ Goethit pH 3; ■ Goethit pH 5; ○ Fe(OH)_3 pH 3; ● Fe(OH)_3 pH 5; (B) □ FePP_i pH 3; ■ FePP_i pH 5; ○ FeCitrat pH 3; ● FeCitrat pH 5 (C) △ $\text{Fe(III)}_3(\text{SO}_4)_2$ pH 2,2.	62
Abbildung 3.13 Nachweis des Vorkommens von bestimmten Bakteriengruppen über eine Verdünnungs-PCR mit gruppenspezifischen Primern.	63
Abbildung 3.14 Phylogenetische Verwandtschaft der <i>Acidiphilium</i> -Klone aus Zone I und Zone III. Die blauen Klone wurden ausschließlich in der Klonbibliothek aus der Zone III, die roten Klone aus den Klonbibliotheken aus den Zonen I und Zone III erhalten.	65
Abbildung 3.15 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der mit den <i>Geobacter</i> -Primern erhaltenen Klonsequenzen (blau). Zusätzlich zu diesen Klonsequenzen sind die Klonsequenzen aus der allgemeinen Klonbibliothek (siehe 3.5) aufgeführt.	67
Abbildung 3.16 Verlauf der Zellzahl und des pH im Sediment von Restsee 77. (●), Zellen/ml DAPI; (○) pH-Wert.	68
Abbildung 3.17 Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (A) und Zone III (B) durch Zugabe einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III bei unterschiedlichen pH-Werten. pH 2,9 (▲/△); pH 5,3 (■/□). Die Ausgefüllten Symbole stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen in den Ansätzen ohne Huminstoff-Lösung dar, während die offenen Symbole $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen in den Ansätzen mit Huminstoff-Lösung darstellen.	72
Abbildung 3.18 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} (●) und MB_{HZIV} (■) mit einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III als Substrat für die Fe(III) -Reduktion bei pH 5,5. Die offenen Symbole (○/□) stellen die Messwerte der Kontrollansätze zu MB_{HZI} und MB_{HZIII} ohne Huminstoff-Lösung dar, während (△) die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in der chemischen Kontrolle wiedergibt. Dargestellt sind die Messwerte und die Standardabweichung von zwei Parallelansätzen.....	75
Abbildung 3.19 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} (●) und MB_{HZIV} (■) mit einer Huminstoff-Lösung aus der Zone I bei pH 3 (A) und pH 5,5 (B). Die offenen Symbole (○/□) stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Ansätzen ohne Huminstoff-Lösung dar, bzw. in den chemischen Kontrollen ohne Inokulum (△). Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelmessungen.	76

- Abbildung 3.20 Zeitlicher Verlauf von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ (A), $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ (B), S-Verbindungen (C) und Sulfat (D) während der Sulfatreduktion mit 5 mM Acetat als Elektronendonator in Zone III. Die dargestellten Messwerte sind der Mittelwert aus drei Parallelansätzen mit den Standardabweichungen. Die ausgefüllten Symbole sind die Messwerte aus den Mikrokosmen mit zugesetztem Acetat. Die unterschiedlichen Schwefel-Pools im stimulierten Ansatz sind in (c) dargestellt..... 85
- Abbildung 3.21 Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung durch elementaren Schwefel (10 mM). Dargestellt ist der Verlauf von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ (A: Zone I; C: Zone III) und Sulfat (B: Zone I; D: Zone III). Die ausgefüllten Symbole stellen die mit elementarem Schwefel stimulierten Ansätze dar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Parallelmessungen mit den Standardabweichungen..... 87
- Abbildung 3.22 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit (40 mM) in den Anreicherungskulturen MB1 (Δ) und MB2 (\square) in Mineralmedium mit Na_2S (5 mM) als Elektronendonator bei 20°C und bei pH 3 (A) und pH 5 (B). Die ausgefüllten Symbole stellen die Ansätze mit Inokulum, aber ohne Na_2S dar; chemische Kontrolle (O) Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelwerte. 88
- Abbildung 3.23 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Medien mit löslichen Fe(III) -Formen durch die Anreicherungskulturen MB1 und MB2. FePP_i -Medium bei pH3 (A) und pH 5 (B), FeCitrat -Medium bei pH 3 (C) und pH 5 (D)..... 91
- Abbildung 3.24 Phylogenetischer Baum basierend auf der 16s rDNA-Gensequenz von Stamm MB3 und den nächsten verwandten Sequenzen..... 92
- Abbildung 3.25 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Fe(OH)_3 mit 10 mM Thiosulfat bei pH 5 durch die Anreicherungskulturen MB1(\bullet) und MB2 (\blacksquare). Die offenen Symbole (O MB1; \square MB2) stellen die Messwerte für die Kontrollansätze ohne Thiosulfat sowie den Kontrollansatz nur mit Thiosulfat (\diamond) dar. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus zwei Parallelansätzen. 93
- Abbildung 3.26 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung (\bullet) aus Schwertmannit_{sterilf.} mit 5 mM Na_2S bei pH 3 (A) und (B); und in den Kontrollansätzen mit Inokulum ohne Na_2S (Δ) und ohne Inokulum mit Na_2S (\circ). Bei den Dargestellten Messwerten handelt es sich um Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus jeweils zwei Parallelansätzen. 95
- Abbildung 3.27 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den mit Sedimentmaterial aus Zone III (A) inokulierten Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in Mineralmedium mit 40 mM Fe(OH)_3 , 5 mM Na_2S und CO_2 . (B) inokulierten Kontrollansätze ohne Na_2S 98
- Abbildung 3.28 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Fe(OH)_3 durch MB3 bei der Schwefeldisproportionierung bei den Temperaturen 2°C (O), 15°C (Δ), 20°C (\blacksquare), 30°C (\blacktriangle) und 40°C (\bullet). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus jeweils drei parallelen Ansätzen. 100
- Abbildung 3.29 Phylogenetischer Baum basierend auf der 16s rDNA-Gensequenz von Stamm MB3 und den nächsten verwandten Sequenzen..... 101
- Abbildung 3.30 Freisetzung von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ aus Fe(OH)_3 und von Sulfat aus elementarem Schwefel (A) oder Thiosulfat (B) durch Anreicherungskultur MB3. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Parallelen mit den Standardabweichungen. Fe(II) (\bullet); S^0 (\square); Thiosulfat (Δ); Sulfat (\blacktriangle)...... 102
- Abbildung 6.1 Das Bild zeigt das Chromatogramm eines typischen Oberflächenwassers. 138
- Abbildung 6.2 Einfluss von Na_2S (\blacktriangle), Thiosulfat (\blacksquare) und Tetrathionat (\blacklozenge) auf $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (A) und Zone III (B) bei 15°C. Als Kontrolle

diente unbehandeltes Sediment (O). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus jeweils drei parallelen Ansätzen.	146
Abbildung 6.3 Fe(II) _{ges.} -Freisetzung aus Schwertmannit (40 mM) im Originalentransfer sowie den Folgetransfers 1-3 in den Anreicherungskulturen MB1 (▲) und MB2 (■) in Mineralmedium mit Na ₂ S (5 mM) als Elektronendonator bei 20°C und bei pH 3 (A) und pH 5 (B); chemische Kontrolle (O). Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelwerte.....	147
Abbildung 6.4 Phylogenetische Analyse der erhaltenen Klonsequenzen aus allen molekularbiologischen Methoden. Für die Berechnung wurden nur solche Sequenzen verwendet, bei denen eine Alignment möglich war. Allgemeine Klonbibliothek (rot); DGGE-Klonbibliothek (grün); Klonbibliotheken aus der Verdünnungs-PCR (blau). Die Sequenzen wurden mit einem speziellen ARB-Tool in einen Distanz-Matrix-Baum hinzugefügt, ohne die Topologie des Baumes zu verändern. Der eingezeichnete Balken ist ein Maß für eine 10%ige Sequenzabweichung.	148

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Primer zur Amplifizierung der 16S rDNA unterschiedlicher Bakteriengruppen.	28
Tabelle 2.2	TSB-Medium	34
Tabelle 2.3	Thio-Medium.....	34
Tabelle 2.4	Acido-Medium	34
Tabelle 2.5	Medium 70.....	34
Tabelle 3.1	Klassifizierung des Sediments aus Restsee 77 ^{a)}	40
Tabelle 3.2	Vergleich der auf das Frischgewicht und das Trockengewicht bezogenen Freisetzungsraten von Fe(II) _{ges.} in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III des Sedimentes von Restsee 77.....	40
Tabelle 3.3	Zusammensetzung der DGGE-Klonbibliotheken aus Zone I und Zone III des Sedimentes von Restsee 77.....	46
Tabelle 3.4	Signalintensitäten der 16S rRNA-Gensonden für sulfatreduzierende Bakterien und Archaeen. Sonden, deren Signalintensität ≥ 2 betrug und somit als positives Signal gewertet wurden, sind fett vorgehoben.	52
Tabelle 3.5	Bestimmung der Zellzahl/ml mittels DAPI-Färbung in den Versuchsansätzen zu den Zeitpunkten t_0 und t_{35} im Versuch mit <i>A. capsulatum</i>	60
Tabelle 3.6	Fe(II) _{ges.} -Konzentrationen in den Kontrollansätzen. Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelmessungen.....	61
Tabelle 3.7	Bestimmung der Keimzahlen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% von Huminstoff-Verwertenden Fe(III)-reduzierenden Mikroorganismen in den Zonen I, III und IV von Restsee 77.....	74
Tabelle 3.8	Beschreibung der Isolate KF1 bis KF5 aus den Anreicherungskulturen MB _{HZIII} und MB _{HZIV} mit der Zone III-Huminstoff-Lösung aus Restsee 77.....	77
Tabelle 3.9	Verwendung der Kohlenstofffraktionen aus Restsee 77 und 116.	78
Tabelle 3.10	Umsatz von Na ₂ S an unterschiedlichen Fe(III)-Formen bei pH 3 und pH 5.....	81
Tabelle 3.11	Konzentrationen der unterschiedlichen Schwefelverbindungen in den Acetat stimulierten Ansätzen und in den Kontrollansätzen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten.....	83
Tabelle 3.12	Fe(II) _{ges.} -Freisetzungsraten in der Originalanreicherung und den Folgetransfers durch MB1 und MB2 bei unterschiedlichen pH-Werten mit Na ₂ S aus Schwertmannit _{sterilf.}	90
Tabelle 3.13	Gehalte der unterschiedlichen anorganischen Schwefelverbindungen und Fe(II) _{ges.} -Konzentration in der Anreicherungskultur MB2 bei pH 3 und pH 5 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten.....	96
Tabelle 3.14	Gehalte der unterschiedlichen anorganischen Schwefelverbindungen und Fe(II) _{ges.} -Konzentration in den Ansätzen zur chemischen Kontrolle bei pH 3 und pH 5 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten.....	97
Tabelle 3.15	Sulfatkonzentration zu Versuchsbeginn (t_0) und Versuchsende (t_{Ende}) in Kultur MB3 mit unterschiedlichen Elektronendonoren. Bei den dargestellten Konzentrationswerten handelt es sich um den Mittelwert aus zwei Parallelansätzen sowie der Standardabweichung.....	101

Tabelle 3.16	Konzentration von Fe(II) und den Schwefelverbindungen zum Versuchsbeginn (t_0) und zum Versuchsende (t_{Ende}) bei der Disproportionierung von elementarem Schwefel und Thiosulfat durch Isolat MB3 bei pH 5 in Gegenwart von 40 mM Fe(OH) ₃ .	103
Tabelle 6.1	Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set Gb564/Gb1290...	140
Tabelle 6.2	Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set GM3/Geo825R. ..	142
Tabelle 6.3	Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I, II und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set (Acido594F/Acido1150R), (Gx182F/Gx472R), Shw783F/Shw1245R) und (Ferro458F/Ferro1473R).....	143
Tabelle 6.4	Ergebnisse der Huminstoff-Analyse	144
Tabelle 6.5	Gärungsprodukte aus Glucose durch <i>A. capsulatum</i> und Wiederfindung der Elektronen im Fe(II) aus der Verbrauchten Glukose.....	145

IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMD	<i>Acid Mine Drainage</i> (saure Minenabwässer)
APS	Ammoniumpersulfat
AVS	<i>Acid Volatile Sulfur</i> (säureflüchtiger Schwefel)
d	Tag
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindole
DGGE	Dichtegradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonuclein Acid
DNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i> (gelöster organischer Kohlenstoff)
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
Fe(OH) ₃	Eisen(III)-hydroxyd
FeCitrat	Eisen(III)-Citrat
FePP _i	Eisen(III)-Pyrophosphat
FISH	<i>Fluorescens in situ Hybridisation</i>
FRB	eisenreduzierende Bakterien
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
LAUBAG	Lausitzer Braunkohle AG
m	Milli
M	Mol / Liter
μ	Mikro
μl	Mikroliter
μM	Mikromol / Liter
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol / Liter
mM	Millimolar
MPN	Most Probable Number
Na ₂ S	Natriumsulfid
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
PBS	Phosphor Buffered Saline Buffer
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Pattern</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>Rounds per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S°	elementarer Schwefel

S^0_{flowable}	<i>Flowable Sulfur</i> (löslicher Schwefel)
SRB	sulfatreduzierende Bakterien
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TRIS ¹	<i>Total Reduced Inorganic Sulfur</i> (reduzierter anorganischer Schwefel)
TRIS ²	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth

V. Zusammenfassung

Das Sediment im Restsee 77 wird durch den Verlauf des pH-Wertes mit der Tiefe dominiert. Dieser liegt im oberen Bereich relativ konstant bei 3 und steigt mit der Tiefe auf Werte von 5,5-6 an. Der Anstieg im pH erfolgt dabei in einem sehr engen Bereich von wenigen Zentimetern. Anhand des pH-Verlaufs wurde das Sediment in die Zonen I bis IV unterteilt. In den Zonen I und III konnte eine spontane $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über eine Zeitspanne von ca. 60 Tagen beobachtet werden, wobei diese $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Zone I abhängig vom pH-Wert war. In dieser Zone konnte die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates durch eine Anhebung des pH um den Faktor 2,2 gesteigert werden. Für die Zone III konnte bei einer Absenkung des pH-Wertes hingegen kein eindeutiger Effekt beobachtet werden. Mit Anstieg des pH im Sediment konnte zwar eine Abnahme der Zellzahl/ml beobachtet werden, die Diversität der Mikrobiota stieg jedoch an. Dies konnte mit drei unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden bestätigt werden. Die allgemeine Klonbibliothek sowie die DGGE-Klonbibliothek aus der Zonen III wiesen eine höhere Diversität auf als die entsprechenden Klonbibliotheken aus der Zone I.

Dominierend in beiden Zonen war die Gruppe der Acidobacteria. Diese Gruppe ist nach bisherigen Erkenntnissen ubiquitär verteilt und ließ sich in vielen unterschiedlichen Habitaten nachweisen. Allerdings ist bis heute mit *A. capsulatum* nur eine Art kultiviert worden, von der eine dissimilatorische Fe(III)-Reduktion nicht bekannt ist. Insgesamt konnte mit der allgemeinen Klondatenbank kein Hinweis auf eine spezifische Fe(III)-reduzierende Mikrobiota erhalten werden. Von den bis heute bekannten dissimilatorischen Fe(III)-Reduzierern wurden nur Vertreter aus der Gruppe der *Geobacteriaceae* gefunden. Mit dem Primer-Set GM3/Geo825R für *Geobacter* konnte ein positives Signal in Zone III bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} erhalten werden. In Zone I und Zone II lag die höchste positive Verdünnungsstufe bei 10^0 . Mit dem Primer-Set Gb564/Gb1290 ergab sich ein leicht abgewandeltes Bild. Mit diesen Primern lag die höchste positive Verdünnungsstufe in Zone II und Zone III bei 10^{-2} . Hingegen konnte in Zone I nur mit der unverdünnten DNA ein positives Signal erhalten werden. Mit den für *Geothrix* spezifischen Primern konnte nur in Zone II bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} ein positives Signal erhalten werden. Allerdings bestand das erhaltene Produkt aus einer Doppelbande, was auf eine unspezifischen Reaktion während der PCR hindeutet. Kein positives Signal konnte für *Shewanella* erhalten werden.

Für die azidophilen Fe(III)-Reduzierer konnte eine Anpassung an die einzelnen Zonen beobachtet werden. In den Klonbibliotheken der *Acidiphilium*-Arten, konnten insgesamt acht unterschiedliche Phylotypen differenziert werden. Von diesen acht Phylotypen konnten vier

sowohl in Zone I als auch in Zone III nachgewiesen werden. Die restlichen vier Phylotypen wurden hingegen nur in Zone III nachgewiesen. Ein Sequenzvergleich der vier Phylotypen aus Zone I und Zone III mit der EMBL-Datenbank ergab ausschließliche Ähnlichkeiten von 99% zu *Acidiphilium*-Spezies. Die Sequenzen der vier Phylotypen aus Zone III waren hingegen zu 95% sequenzähnlich zu kultivierten *Acidiphilium* oder *Acidosphaera* Spezies. Eine phylogenetische Analyse der erhaltenen acht Sequenzen ergab zwei Gruppen. Gruppe 1 enthält die Phylotypen, die nur in Zone III gefunden wurden. Die Phylotypen von Zone I und Zone III clusterten in Gruppe 2. Für die 'Bioleaching-Assoziierten'-16S rDNA wurden 20 Klone aus Zone I und 28 Klone aus Zone III auf redundante Klone über RFLP gescreent, wobei nur 1 Phylotyp mit 99%ige Sequenzähnlichkeit mit *A. ferrooxidans* unterschieden werden konnte. *A. ferrooxidans* reduziert unter sauren pH-Bedingungen (pH 3) mit 20 mM S^0 als Elektronenquelle alle getesteten Eisenfestphasen, wobei die $Fe(II)_{ges}$ -Freisetzung mit abnehmender Kristallinität der $Fe(III)$ -Minerale zunimmt. Unter erhöhten pH-Bedingungen (pH 5) erfolgte keine nennenswerte $Fe(III)$ -Reduktion. Die Ergebnisse mit den Reinkulturen deuten darauf hin, dass autotrophe azidophile $Fe(III)$ -Reduzierer unter erhöhten pH-Werten keinen Beitrag zur $Fe(III)$ -Reduktion in Zone III leisten. Eine $Fe(III)$ -Reduktion konnte ebenfalls für den heterotrophen Modellorganismus *A. capsulatum* gezeigt werden. In Reinkulturexperimenten mit *A. capsulatum* wurde die Fähigkeit zur $Fe(III)$ -Reduktion getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl $Fe(III)$ -Minerale als auch lösliche $Fe(III)$ -Formen in einem pH-Bereich von 2,2-5 reduziert werden. Hierbei werden zwischen 5 und 40% der aus der Glukoseoxidation gewonnenen Elektronen auf $Fe(III)$ übertragen.

Die von PEINE (1998) formulierte Hypothese einer Kopplung des Schwefel- und Eisenkreislaufs konnte an der Untersuchung von zwei Anreicherungskulturen sowie einem Isolat demonstriert werden. Hierbei konnten zwei unterschiedliche Prozesse identifiziert werden. Bei den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 handelt es sich um eine Oxidation von elementarem Schwefel bzw. Thiosulfat, wobei die Elektronen auf die $Fe(III)$ -Minerale übertragen werden. Isolat MB3 betreibt hingegen eine Disproportionierung, bei der das gebildete Sulfid mit den $Fe(III)$ -Mineralen in einer chemischen Reaktion zu $Fe(II)$ und elementarem Schwefel reagiert, was in einem weiteren Schritt zu Sulfid und Sulfat disproportioniert wird. Beide Prozesse gehen vom elementarem Schwefel aus, der im Sediment durch eine Reaktion des Sulfids aus der Sulfatreduktion mit den $Fe(III)$ -Mineralen entsteht. Die Bildung von elementarem Schwefel als Reaktionsprodukt aus der chemischen Reaktion von Na_2S mit $Fe(III)$ unter sauren Bedingungen konnte sowohl in Batch-Versuchen als auch in Mikrokosmenexperimenten gezeigt werden.

VI. Summary

The sediment in lake 77 is characterised by the pH. In the upper part the pH is constant around 3 and increase with the depth to pH 5,5-6. The increase of the pH takes place in a narrow range. This characteristic pH trend was used to separate the sediment into four different zones. In zone I and III a spontaneous $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -release was observed over 60 days. In Zone I $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -release was pH-dependent. Parallel to the rising pH the total cell numbers decrease while the microbial diversity increased. This was confirmed with different molecular methods like DGGE or clone libraries.

A dominating bacterial group in zone I and zone III common clone libraries were members of the Acidobacteria and a iron reducing microbiota was not found. In a "dilution-PCR" with specific primers for *Geobacter* a positive signal was obtained in zone III up to a 10^{-3} dilution. In zone I and II a signal was obtained only with undiluted DNA. No signal were obtained with specific primer-set for *Geothrix* or *Shewanella* species.

For the acidophilic iron reducers a adaptation to the different zones was observed. 8 different phylo-types for *Acidiphilium*-species were found by cloning procedure. 4 of this phylo-types were found in zone I and zone III while the remaining were found in zone III only. The 16S-sequence of all this 8 phylo-types were similar to *Acidiphilium*-species.

For the „bioleaching-associated“ microbiota like *Acidithiobacillus ferrooxidans* only one phylo-type were found in zone I and zone III. From this results we conclude that the high diversity of the heterotrophic acidophilic iron reducers is

In pure-culture experiments *A. ferrooxidans* was capable to reduce iron with elemental sulphur only under pH 3. The capacity of iron reduction increased with higher crystallinity of the tested iron minerals. From this results we conclude that the autotrophic acidophilic iron reducers have no contribute to iron reduction under slightly acidic pH conditions.

The postulated hypothesis of a coupled iron-sulfur cycle in the sediment of lake 77 by PEINE (1998) could be confirmed by investigation of two enrichment cultures and one isolate. We were able to differentiate between two processes. The two enrichment cultures MB1 and MB2 oxidised elemental sulphur and thiosulfate respectively. During this oxidation Fe(III) was reduced. In contrast isolate MB3 disproportionated elemental sulphur to sulphate and sulphide. The end product sulphide reacted chemically with the iron minerals to Fe(II) and elemental sulphur. Both processes starts from elemental sulphur which can be accounted as a "end product" of the sulphate reduction in the sediment by a chemical reaction of the sulphide with the iron minerals.

1 Einleitung

1.1 Zusammensetzung von Biozönosen

Mikroorganismen spielen als Destruenten beim Prozess der Mineralisation organischer Substanz eine übergeordnete Rolle in den Stoffkreisläufen von Ökosystemen. Allgemein unterliegen alle Organismen seit ihrer Entstehung den Einflüssen ihrer unbelebten Umwelt, den abiotischen Faktoren (MÜLLER 1984). Gleichzeitig sind sie aber auf deren Energie und Materie angewiesen und somit von deren Umfang und Schwankungen abhängig. Als überindividuelle Verbände (Populationen oder Biozönosen) entwickeln Organismen Einflüsse auf ihre unbelebte Umwelt; sie wirken dann als Faktoren auf anderer Elemente im Ökosystem. Die Wechselwirkung von abiotischen Faktoren und den Organismen einer Biozönose sind Gegenstand der zwei biozönotischen Grundprinzipien (THIENEMANN 1920).

„Je vielseitiger die Lebensbedingungen in einem Biotop sind, desto größer ist die Artenzahl in der zugehörigen Biozönose. Es kommen dabei zahlreiche Arten mit unterschiedlichen Lebensansprüchen zur Entfaltung, da die Zahl der ökologischen Nischen relativ groß ist. Hierbei sind die Individuenzahlen relativ klein.“

„Je einseitiger die Lebensbedingungen sind, desto artenärmer ist die Biozönose. Die einzelnen Arten erreichen hierbei hohe Individuendichten. Dies wird dadurch erreicht, dass sich die Intensität eines oder mehrere abiotischer Faktoren für die Mehrzahl der Arten pessimal auswirkt.“

Um ein Verständnis von Ökosystemen zu erreichen, ist neben der Kenntnis der abiotischen Faktoren auch die Kenntnis der Biozönose (die Diversität der vorkommenden Organismen), eine wichtige Voraussetzung. Nur über die Artenkenntnis lassen sich mögliche Aussagen über die Funktion von Biozönosen in Ökosystemen treffen. Diesen wichtigen Umstand drückte VAN STEENIS (1957) so aus:

"A plant's name is the key to its literature - in other words, the key to what we know about it."

1.2 Diversität

Die Biodiversitätsforschung beschäftigt sich unter anderem mit der Erfassung und Beschreibung der taxonomischen und funktionalen Vielfalt von Biozönosen, wobei der Taxonomie ein grundlegende Aufgabe zukommt (SCHÄFER 2003). Die Taxonomie befasst sich mit der Einteilung der Organismen in Taxa (Sing.: Taxon = Gruppe) aufgrund von Gemeinsamkeiten. In der makroskopischen Tier- und Pflanzenwelt erfolgt die taxonomische Einteilung fast ausschließlich auf der Basis morphologischer Merkmale. Zur Zeit von Aristoteles (um 330 v. Chr.) waren ca. 500 Tierarten beschrieben; rund 2000 Jahre danach führte Carl von Linné (1707-1778) in seiner 10. Auflage des *Systema Naturae* bereits 4776 Arten auf. Heute, 230 Jahre später, sind weit über 1,4 Millionen Tierarten beschrieben, davon alleine ca. 950.000 Insektenarten (SCHMITT 1994). Ging es in der Taxonomie zuerst nur um die Kategorisierung der Arten, so verschob sich mit der wissenschaftlichen Anerkennung der Entwicklung der Evolutionstheorie (DARWIN 1963) ihr Ziel. Nach 1859 war es das erklärte Ziel der Systematiker und Taxonomen, durch das Auffinden natürlicher Gruppen die Evolution der Organismen nachzuzeichnen.

In der Taxonomie und Phylogenie der Bakterien stellt die Reinkultur, der Stamm, die Grundeinheit für die wissenschaftliche Arbeit dar, welche zu Arten, diese zu Gattungen und letztendlich zu Familien zusammengefasst werden. Im Gegensatz zur makroskopischen Welt ergeben sich bei der taxonomischen Beschreibung von Bakterien erhebliche Schwierigkeiten, da diese sich zum einen aufgrund ihrer geringen Größe einer unmittelbaren Beobachtung entziehen; so wurde diese mikroskopische Form des Lebens auch erst 1672 durch ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1632-1723) unter Verwendung eines Mikroskops erstmals beobachtet und beschrieben. Zum anderen gibt es bei den Bakterien nur wenige morphologische Unterscheidungsmerkmale, weshalb bei deren Taxonomie chemische, physiologische und genetische Merkmale die Hauptrolle spielen.

1.3 Diversitätserfassung mikrobieller Biozönosen

Die Beschreibung von mikrobiellen Diversitäten in Biozönosen erfolgte am Anfang über kultivierungsabhängige Methoden (AMANN ET AL. 1995). Dies bedeutete aber auch immer eine Selektion, da durch die gewählten Kultivierungsbedingungen (Kulturmedien, Temperatur, Substrate, etc.) auch immer nur eine Teilpopulation erfasst wurde. So lassen sich nur <1% der natürlich vorkommenden Bakterien mit den herkömmlichen Kultivierungsmethoden in Reinkultur erhalten (WAGNER ET AL. 1993, AMANN ET AL. 1995).

Erst in letzter Zeit haben neue Ansätze in der Kultivierungstechnik einen Fortschritt erbracht. So konnte die Kultivierbarkeit von Bakterien aus Böden auf über 14% gesteigert (JANSSEN ET

AL. 2002) und neue Arten isoliert werden (KAEBERLEIN ET AL. 2002, ZENGLER ET AL. 2002). Dennoch bleibt der Anteil der kultivierbaren Spezies gering. Nicht zuletzt deshalb, weil weder die genauen Kultivierungsbedingungen bekannt sind, noch weil viele Mikroorganismen aufgrund ihrer Wechselwirkung mit ihrer Umwelt oder anderen Organismen nicht vereinzelt werden können ohne die genaue Kenntnis dieser Wechselwirkungen.

Daraus erklärt sich, dass bisher erst ca. 4500 Bakterien-Arten beschrieben sind (TORSVIK ET AL. 2002, HEYWOOD 1995). Erst mit der Einführung molekularbiologischer Methoden konnte diese Restriktion teilweise überwunden werden. Molekularbiologische Untersuchungen auf Basis der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene ergaben, dass die Bakterien (Prokaryonten) sich in zwei Hauptentwicklungslinien, den Archaea und den Bacteria, unterscheiden lassen, deren phylogenetische Tiefe insgesamt größer ist als die der Eukaryonten (WOESE 1987, WOESE ET AL. 1990). Die zunehmende Anwendung von Techniken zur Klonierung der 16S rRNA-Gene hat zu einer Verdreifachung der phylogenetischen Gruppen geführt. Während die ersten molekularbiologischen Untersuchungen (WOESE 1987) die Bakterien als eine Zusammensetzung aus 12 Gruppen beschrieb, sind heute mittlerweile 36 Gruppen durch die Analyse von mehr als 15.000 rRNA-Gensequenzen beschrieben. Von diesen 36 Gruppen sind 13 ausschließlich durch 16S rRNA-Sequenzen definiert; einen kultivierten Vertreter dieser Gruppen gibt es jedoch bisher nicht (DOJKA ET AL. 1998). Heutige Schätzungen gehen von 1,5–14 Millionen existierenden Bakterienarten aus (PALLERONI 1997). Die Erstellung von Klonbibliotheken basiert auf der direkten Isolierung von DNA aus Umweltproben. Diese wird als Matrize zur Amplifizierung der 16S rRNA-Gene in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt (OLSEN ET AL. 1986). Je nach Fragestellung kommen hierbei gruppenspezifische oder allgemeine Oligonukleotide als Startermoleküle (Primer) zur Anwendung. Die erhaltenen PCR-Produkte können dann durch Klonierung und Sequenzierung zur phylogenetischen Analyse verwendet werden.

Diversitätsanalysen mittels 16S rRNA-Klonbibliotheken bieten die größtmögliche Auflösung. Ein alleiniger Nachweis von 16S rRNA-Sequenzen ist jedoch nicht geeignet, um Aussagen über die Funktion mikrobieller Lebensgemeinschaften in Bezug auf ihre Umwelt zu machen. Die zunehmende Kenntnis der bakteriellen Diversität ohne gleichzeitigen Kenntnisgewinn über deren Physiologie und damit deren Funktion in den Ökosystemen, ist bis heute in der molekularen mikrobiellen Ökologie ein ungelöstes Problem (LIESACK ET AL. 1997). Um Aussagen über den Einfluss abiotischer Faktoren auf mikrobielle Lebensgemeinschaften zu treffen, wurden *fingerprinting*-Methoden entwickelt; zu denen die Methoden DGGE (MUYZER ET AL. 1993), T-RFLP (LIU ET AL. 1997, CLEMENT ET AL. 1998, DUNBAR ET AL. 2000) oder SSCP (LEE ET AL. 1996) gezählt werden. *Fingerprinting*-Methoden haben gegenüber der Klonierung

den Vorteil, dass sie dynamische Veränderungen in einer Gemeinschaft sehr leicht abbilden können (MUYZER ET AL. 1993).

1.4 Mikrobielle Diversität extremer Ökosysteme

Organismen benötigen bzw. tolerieren die auf sie wirkenden abiotischen Faktoren nur in bestimmten Intensitäten, da sie diesen gegenüber nur über begrenzte Reaktionsbreiten (= Potenz- bzw. Toleranzbereiche) verfügen. Die abiotischen Faktoren stellen ihrerseits nur begrenzte Schwankungsbreiten (= Valenzbereiche), als Lizenzen für die Entfaltung des Lebens, zur Verfügung (MÜLLER 1984). Nehmen ein oder mehrere Faktoren in einem Ökosystem einen extremen, aber konstanten Wert an (z.B. Salzgehalt in Gewässern), bzw. unterliegen sehr hohen Schwankungen (z.B. Temperaturwechsel im Tagesverlauf), sind die Voraussetzungen für ein extremes Ökosystem gegeben (SCHÄFER 2003). Wann jedoch ein Faktor als "extrem" angesehen werden kann, wird häufig an menschlichen Standards gemessen (SHERIDAN ET AL. 2003).

Für ökologische Untersuchungen sind extreme Ökosysteme aus unterschiedlichen Aspekten von großem Interesse. So hat das Interesse an der mikrobiellen Diversität und Überlebensfähigkeit von Bakterien in gefrorenen Gletschereisproben aus der Arktis und Antarktis durch die postulierte Möglichkeit von extraterrestrischem Leben z.B. auf dem Jupitermond Europa zugenommen (GREENBERG 2002). Molekularbiologische Untersuchungen an grönländischen Gletschereisproben aus 3000 m Tiefe, deren Alter auf über 100.000 Jahre geschätzt wird, ergaben eine Vielzahl an Klonsequenzen mit großen Ähnlichkeiten zu bekannten kultivierten Organismen der α -, β - und γ -Proteobakterien (SHERIDAN ET AL. 2003). Eine Klonsequenz hingegen wies mit 88% eine maximale Sequenzähnlichkeit zu *Peptostreptococcus* genosp.4 auf, was als ein möglicher Repräsentant einer neuen Ordnung oder Familie bewertet wurde. Vergleichende Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität in Eisproben aus der Arktis und der Antarktis ergaben einen hohen Anteil an gemeinsamen 16S rRNA-Genen (BRINKMEYER ET AL. 2003, BROWN UND BOWMAN 2001).

Ein weiterer Aspekt bezieht sich auf die komplexen ökologischen Zusammenhänge. Diese lassen sich nach allgemeiner Auffassung in extremen Habitaten besser untersuchen, da hier sowohl die Diversität als auch die Anzahl möglicher ökologischer Nischen durch das Vorherrschen einzelner abiotischer Faktoren reduziert sind (EDWARDS ET AL. 1999). Extreme Ökosysteme, die z.B. durch einen sauren pH gekennzeichnet sind, entstehen häufig durch chemische Verwitterung von Pyrit, in deren Folge es zur Bildung heißer und saurer Abwässer kommt. Speziell durch Bergbautätigkeiten zur Gewinnung von Edelmetallen wird dieser Prozess noch verstärkt, da hierbei pyrithaltiges Gestein mit Luftsauerstoff in Kontakt kommt

(SINGER UND STUMM 1970, SINGH ET AL. 1997). So stellen die durch saure Minenabwässer (AMD = acid mining drainage) verursachten Umweltprobleme vielfach ein Problem dar (BOND ET AL. 2000A). Da diese Ökosysteme trotz einem pH-Wert <2 von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt sind, welche die Bildung der sauren Minenabwässer sogar noch verstärken, wurden diese in den letzten Jahren intensiv untersucht (BRETT ET AL. 2003). Molekularbiologische Untersuchungen an der Richmond Mine (Iron Mountain, California) ergaben, dass die dort vorkommende Population in ihrer Zusammensetzung und Anzahl durch Veränderungen sowohl im Jahresverlauf als auch von geochemischen Faktoren wie pH, Temperatur und Metallgehalt beeinflusst ist. Insgesamt konnte aber nur eine kleine Anzahl an bereits bekannten Bakteriengruppen nachgewiesen werden (EDWARDS ET AL. 1999; BOND UND BANFIELD 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten mit Kultivierungsmethoden an einer Mine in Norwegen erzielt werden (GOEBEL UND STACKEBRANDT 1994).

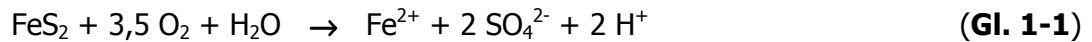
Die Untersuchung saurer Habitate erfolgte häufig an oxischen Bereichen, da die säurebildenden Prozesse in diesen Systemen auf die Oxidation von Fe(II) und reduzierten Schwefelverbindungen zurück gehen (JOHNSON 1998). Wenig Aufmerksamkeit wurde bisher auf die Fe(III)-Reduktion in sauren Habitaten gelegt (FORTIN ET AL. 1996).

Ökosysteme, die in besonderer Weise durch einen sauren pH bestimmt sind, finden sich in den Tagebaurestseen ehemaliger Braunkohlereviere. Speziell die eisenreichen Sedimente dieser sauren Seen stellen extreme Standorte für Mikroorganismen dar, da sie durch niedrige pH-Werte, hohe Sulfat- und Eisenkonzentrationen und einem geringen Angebot an organischer Substanz gekennzeichnet sind.

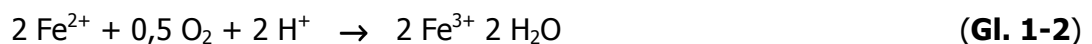
1.5 Die Entstehung saurer Tagebau-Restseen in der Niederlausitz

Braunkohle war lange Zeit ein wichtiger Energieträger. In Ost- und Westdeutschland wurden unter großem Landverbrauch im Zeitraum von 1954 bis 1979 ca. 40 bis 60% der weltweiten Braunkohleproduktion durch Tagebau gefördert (PETRASCHECK 1956, PÄTZ ET AL. 1989). Allein die Abbaufäche im Lausitzer Revier (im östlichen Teil der Bundesrepublik Deutschlands in der Grenzregion zu Polen und den Landesgrenzen Brandenburg/Sachsen) betrug bis 1995 ca. 750km² (LAUBAG 1995). Mit der Tagebauaktivität wurde der Grundwasserspiegel unter die Tagebausohle abgesenkt. Mit dem Wideranstieg nach Stilllegung der Tagebaue kam es zur Flutung der entstandenen Resthohlformen, aus denen sich die Restseen bildeten. Viele Seen weisen eine starke Versauerung (pH <4) sowie hohe Ionenkonzentrationen an Calcium, Eisen, Magnesium, Aluminium und Sulfat auf (HERZSPRUNG ET AL. 1998). Die Versauerung der Restseen in der Niederlausitz entsteht in Folge der Verwitterung von Eisendisulfiden (Pyrit: FeS₂) (GELLER ET AL. 1998). Pyrithaltiges Material gelangte durch die bergbaulichen

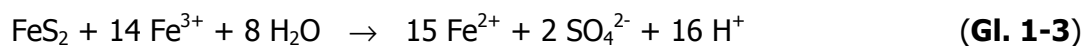
Aktivitäten an die Erdoberfläche. Durch die Deponierung in und um die Resthohlformen kommt es zu einer Umlagerung und Belüftung des Kippenmaterials mit Luftsauerstoff. In einem als Initialreaktion bezeichneten Prozess erfolgt eine chemische Oxidation bei der als Endprodukte Schwefelsäure und Fe(II) entstehen (siehe Gl. 1-1 nach SINGH ET AL. 1997).



Die Freisetzung dieser Produkte führt zur Versauerung des Wassers innerhalb der Abraummateriale (STUMM UND MORGAN 1996). Mit dem Sicker- und Grundwasser gelangen sie in die verbliebenen Hohlformen des Tagebaus, die so genannten Restlöcher (PEINE 1998), in deren Folge es zur Bildung der sauren Restseen kommt (MILLER ET AL. 1996). Durch den sauren pH bleibt das Fe(II) auch in Anwesenheit von Sauerstoff stabil. Während die Halbwertszeit von Fe(II) bei neutralem pH-Wert in Gegenwart von Sauerstoff bei wenigen Minuten liegt, liegt die Halbwertszeit unter sauren pH-Bedingungen (pH<3) bei 6 Jahren (SINGER UND STUMM 1970). Daher erfolgt die Oxidation von Fe(II) unter sauren Bedingungen hauptsächlich durch azidophile Fe(II)-Oxidierer wie z.B. *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* (SINGH ET AL. 1997).



Das gebildete Fe³⁺ ist bei einem pH unter 2,5 löslich und dient als Oxidationsmittel bei der chemischen Oxidation von Pyrit zu Fe²⁺, SO₄²⁻ und Protonen (PRONK UND JOHNSON 1992, HARRISON 1984, SINGH ET AL. 1997).



Die hierbei entstehenden Fe(II)-Ionen unterliegen ebenfalls einer mikrobiellen Oxidation. Dieser Prozess, der im Vergleich zur chemischen Oxidation, zu einer erhöhten Oxidation von Pyrit unter Mitwirkung von Mikroorganismen führt, wird als "*propagation cycle*" bezeichnet (MADIGAN ET AL. 2000).

Neben der Bildung von Schwefelsäure bei der Pyritoxidation, besteht eine weitere Quelle der Säurebildung ist die Hydrolyse der Fe(III)-Ionen (Gl. 1-4).



1.6 Charakterisierung von Restsee 77 in der Niederlausitz

Restsee 77 gehört zu einer untereinander verbundenen Kette von 11 Braunkohlerestseen im Lausitzer Braunkohletagebauegebiet in Brandenburg. Mit der Einstellung des Braunkohletagebaus begann 1964 die Flutung (LANDESUMWELTAMT 1995).

Der Wasserkörper von Restsee 77 unterliegt im Jahresverlauf einer Schichtung. Die Sprungschicht zwischen oxischem Epilimnion und anoxischem Hypolimnion liegt im Frühjahr und Sommer bei ca. 3-4 m Tiefe; im Herbst etwas tiefer. Nur im Winter stellt sich ein gleichmäßiges Tiefenprofil ein. Allerdings stellt sich eine Schichtung nicht jedes Jahr ein (z.B. 1997 nach PEINE 1998). Die Temperatur an der Sediment-Wasser-Grenze liegt im Frühjahr und Sommer bei 10-12°C, im Winter bei 3-4°C (PEINE 1998). Durch die im Spätherbst einsetzende Seezirkulation können an der Sediment-Wasser-Grenze Sauerstoffgehalte von 80-95% gemessen werden. Über weite Teile des Jahres sind anoxische Bedingungen vorherrschend.

Aus den dem See umgebenen pyrithaltigen Kippenmaterial erfolgt eine ständige Anlieferung von Fe^{3+} , SO_4^{2-} und H^+ in den Wasserkörper des Restsees, was die Charakteristik von Restsee 77 nachhaltig beeinflusst. So liegt der pH in der Wassersäule von Restsee 77 über die Tiefe zwischen 2,7 und 3,1. Durch diesen sauren pH liegen die Konzentrationswerte für lösliches Fe(III) sowohl über die Tiefe als auch im Jahresverlauf bei 1-2 mmol l^{-1} . Der Verlauf der löslichen Fe(II)-Konzentrationen im Seekörper ist hingegen durch den Jahresverlauf geprägt. Durch die Schichtung im Frühjahr und Sommer kommt es zu einer Anreicherung im Tiefenwasser auf über 10 mmol l^{-1} . Im oberflächennahen Wasser (0-4 m) erreichen die Konzentrationswerte zu dieser Zeit Werte zwischen 0,01 und 0,08 mmol l^{-1} (PEINE ET AL. 2000). Im Herbst bildet sich ein einheitliches Fe(II)-Konzentrationsprofil um 0,1 mmol l^{-1} aus (PEINE 1998). Ein ähnlicher Jahresverlauf kann auch bei den Sulfatkonzentrationen beobachtet werden. Im Herbst und Winter liegt Sulfat mit ca. 8 mmol l^{-1} im gesamten Wasserkörper vor, während im Frühjahr und Sommer Sulfat im Tiefenwasser bis zu 14 mmol l^{-1} und im oberflächennahen Bereich um 7 mmol l^{-1} liegt (PEINE 1998).

Mit der Oxidation des im Wasser gelösten Fe(II) zu Fe(III) und anschließender Hydrolyse kommt es zur Bildung und Sedimentation von Eisenhydroxiden. Die Sedimentationsraten lagen bei Untersuchungen (Mai 1996 - April 1997) zwischen 1,2 $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (Februar 1997) und 11,7 $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (November 1996) in einer Tiefe von 5,7 m (PEINE 1998). Der Anteil an Eisen und Schwefel an der Gesamtdeposition liegt relativ konstant bei 40 Gew.-% für Eisen und 5 Gew.-% für Schwefel (PEINE ET AL. 2000). Messungen von Sedimentproben am Restloch 77 zeigen, dass im See das sekundäre Eisen(III)-Mineral Schwertmannit ($\text{Fe}_8\text{O}_8\text{OH}_x(\text{SO}_4)_y$) ausfällt und absedimentiert. Schwertmannit wird häufig als Folgeprodukt der Pyritoxidation in sauren Grubenwässern mit hohen Sulfatgehalten gefunden (BIGHAM ET AL. 1990, BIGHAM ET

AL. 1996). Dieser sedimentierte Schwertmannit stellt in den oberen Zentimetern des Sediments das vorherrschende Fe(III)-Mineral dar. Mit zunehmender Tiefe kommt es zu einer Umwandlung in Goethit, welches ab ca. 5 cm das überwiegende Fe(III)-Mineral darstellt (TRITSCHLER 1998, PEINE ET AL. 2000). Der Eisengehalt liegt in den obersten 11 cm bei 350 g kg^{-1} und nimmt auf 20 g kg^{-1} innerhalb weniger Zentimeter ab. Der Schwefelgehalt nimmt bereits in den obersten 5 cm von 40 auf 10 g kg^{-1} ab. Der Hauptanteil am gesamten Schwefel liegt hierbei beim Sulfat, welcher bei 30 g kg^{-1} liegt (PEINE ET AL. 2000). Der Gehalt an reduziertem Schwefel ist bis in ca. 18 cm sehr niedrig und nimmt erst darunter zu. Der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) im Seewasser beträgt zwischen 1,5 und $5,5 \text{ mg l}^{-1}$.

1.7 Reduktive Prozesse im Sediment von See 77

Der Abbau von organischem Material durch mikrobielle Prozesse erfolgt über eine Vielzahl von trophischen Verbindungen, die kollektiv in der Reduktion von energetisch günstigen und verfügbaren Elektronenakzeptoren enden (MCINERNEY UND BRYANT 1981). Eisen(III) als auch Sulfat stellen in den anoxischen Bereichen von Sedimenten wichtige terminale Elektronenakzeptoren bei der Mineralisierung von organischen Substanzen dar (JØRGENSEN 1982, SØRENSEN 1982, LOVLEY UND PHILLIPS 1986A). Eine graphische Zusammenfassung der unter 1.7 dargestellten Fe(III)-reduzierenden Prozesse zeigt Abbildung 1.1. Sowohl der Fe(III)- als auch der Sulfatreduktion ist gemeinsam, dass beide Prozesse hauptsächlich auf verfügbaren Kohlenstoff ($<\text{CH}_2\text{O}>$) als Elektronendonator angewiesen sind; in sauren und anaeroben Ökosystemen kann auch elementarer Schwefel als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion verwendet werden.

1.7.1 Fe(III)-Reduktion

Zur Eisen(III)-Reduktion ist eine Vielzahl von phylogenetisch unterschiedlichen Mikroorganismen befähigt (LONERGAN ET AL. 1996, LOVLEY 1997, LOVLEY UND COATES 2000), die sich auf Grund ihrer Physiologie in fermentative, nicht-fermentative und sulfatreduzierende Gruppen unterteilen lassen (JOHNSON 1995).

Die Gruppe der Fermentierer wurde schon früh untersucht. Bei diesen Vertretern stellt die Fe(III)-Reduktion allerdings nur einen Nebenweg dar. Die Gesamtmenge der Elektronen wird nur zu maximal 5% auf Fe(III) übertragen (LOVLEY 1991, EHRLICH 1996). Aus See 77 konnte mit dem Isolat CH-1, ein Stamm von *Clostridium butyricum*, ein fermentierender Fe(III)-Reduzierer isoliert werden, der 2,3% der Reduktionsäquivalente aus Glukose oder Cellubiose auf Fe(III) übertragen kann (KÜSEL ET AL. 1999). Neben der Gruppe der Fermentierer wurden in den letzten Jahren Bakterien isoliert, die zu einer respiratorischen Fe(III)-Reduktion

(dissimilatorische Fe(III)-Reduktion) befähigt sind. Diese verwenden häufig nicht weiter vergärbare Substrate wie organische Säuren, Alkohole und Wasserstoff als Elektronendonoren. Zu diesen zählen die fakultativ anaeroben *Shewanella*-Spezies (NEALSON UND MYERS 1992) oder die obligat anaeroben *Geobacter*- oder *Geothrix*-Spezies (LOVLEY 1997, COATES ET AL. 1996). Eine wichtige Gruppe der dissimilatorischen Fe(III)-Reduzierer stellt die Familie der *Geobacteraceae* dar, welche sich aus den Gattungen *Geobacter*, *Pelobacter*, *Desulfuromonas* und *Desulfuromusa* zusammensetzt (LONERGAN ET AL. 1996). Die Vertreter dieser Gattungen spielen nach heutiger Auffassung eine wichtige ökologische Rolle unter den Eisenreduzierern, da sie aus unterschiedlichsten pH-neutralen Habitaten wie Süßwasser (LOVLEY UND PHILLIPS 1986A), Grundwasserleitern (SNOEYENBOS-WEST ET AL. 2000) sowie marinen oder estuarinen Sedimenten (LOWE ET AL. 2000) isoliert bzw. über molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden konnten.

Wie von den schwefel- und eisenoxidierenden Mikroorganismen bekannt, gibt es auch unter den Fe(III)-Reduzierern azidophile Vertreter. Zu diesen gehören z.B. die fakultativ anaeroben *Acidiphilium* spp., *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Sulfobacillus* spp. (JOHNSON UND MCGINNESS 1991, BRIDGE UND JOHNSON 1998) sowie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Sulfolobus acidocaldarius* (BROCK UND GUSTAFSON 1976, PRONK ET AL. 1992). Das Vorkommen azidophiler Vertreter im Seesediment konnte durch mehrere Untersuchungen bestätigt werden (KÜSEL ET AL. 1999, MEIER UND BABENZIEN 2000). Bisherige Untersuchungen zur Fe(III)-Reduktion durch azidophile Mikroorganismen erfolgte ausschließlich unter stark sauren Bedingungen (pH ~2) (BROCK UND GUSTAFSON 1976, JOHNSON UND MCGINNESS 1991, PRONK UND JOHNSON 1992). Bei den neutrophilen Fe(III)-Reduzierern erfolgt die Fe(III)-Reduktion fast ausschließlich unter pH-neutralen Bedingungen. Lediglich für das Isolat *Geobacter* CdA-2 ist eine Fe(III)-Reduktion unter leicht sauren Bedingungen (pH 5,5) beschrieben worden (CUMMINGS ET AL. 2000). Somit bleibt die Frage offen, welche Mikroorganismen zu einer Fe(III)-Reduktion im pH-Bereich von 3-5 befähigt sind. Neben den azidophilen Mikroorganismen wie *A. ferrooxidans* oder *Acidiphilium* spp., deren Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion hinlänglich beschrieben wurde, existieren weitere Mikroorganismen, deren Vorkommen in schwefelsauren Habitaten typisch ist. Hierzu gehören die mesophilen Vertreter von *Acidisphaera rubrifaciens*, *Acidobacterium capsulatum* oder *Acidocella* spp. (HIRAISHI ET AL. 2000, JOHNSON 1998). Die Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion dieser Organismen ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

Die dritte Gruppe wird durch einige sulfatreduzierende Bakterien gebildet (JOHNSON 1995). Das bei der Sulfatreduktion gebildete Sulfid kann in einer chemischen Reaktion mit den Fe(III)-Mineralen indirekt zur Fe(III)-Reduktion betragen. Neben diesem indirekten Weg

besteht die Möglichkeit einer direkten Reduktion durch Verwendung von Fe(III) als terminalen Elektronenakzeptor. Ein derartiger Prozess konnte für *Desulfotomaculum reducens* (TEBO UND OBRAZTSOVA 1998), *Desulfotomaculum nigrificans* und *Desulfovibrio desulfuricans* (JONES 1986) gezeigt werden.

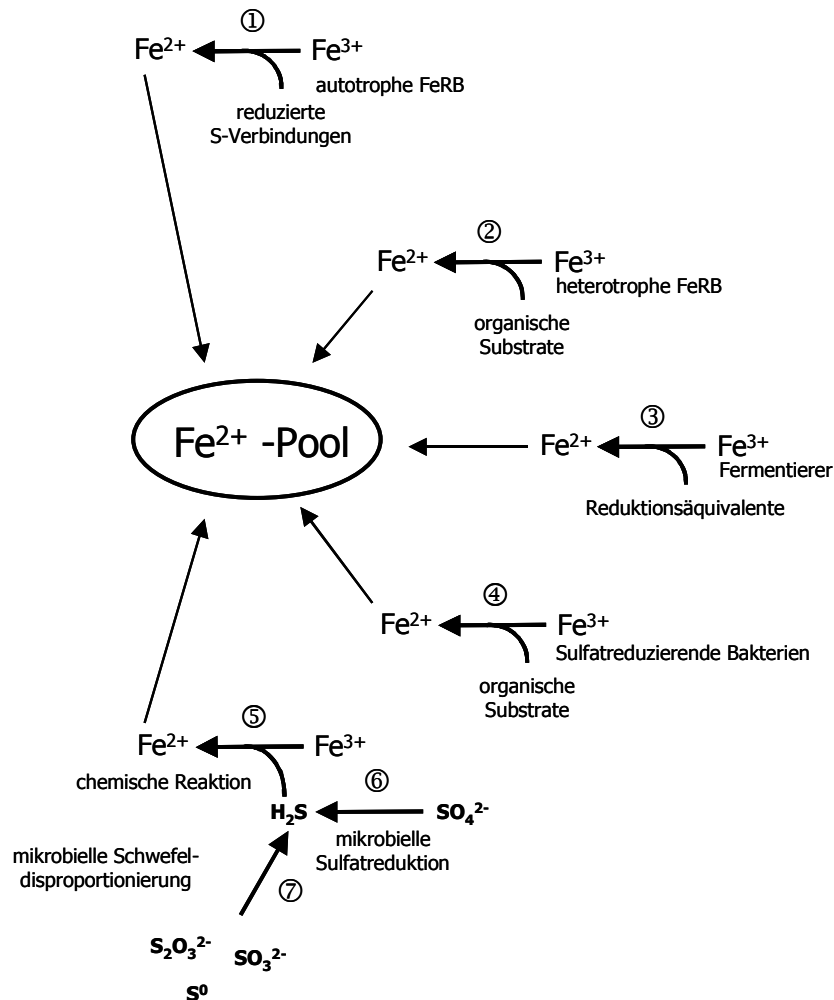


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der an der Fe(III)-Reduktion beteiligten mikrobiellen Prozesse. ① autotrophe Fe(III)-Reduzierer: z.B. *Acidithiobacillus ferrooxidans*; ② heterotrophe Fe(III)-Reduzierer: z.B. *Geobacter metallireducens*; ③ fermentierende Bakterien; ④ sulfatreduzierende Bakterien; ⑤ chemische Reaktion von Sulfid mit Fe(III)-Mineralen; ⑥ Sulfatreduktion; ⑦ Disproportionierung reduzierter Schwefelverbindungen mit nachfolgender chemischer Reduktion von Fe(III) durch Sulfid: z.B. *Desulfocapsa sulfoexigens*.

1.7.2 Sulfatreduktion

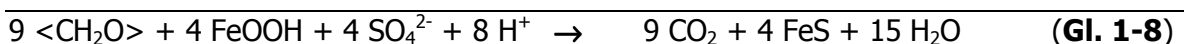
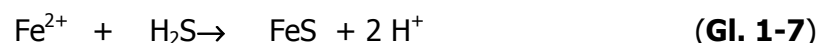
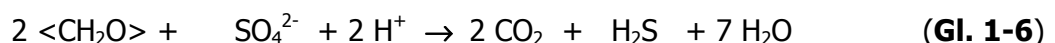
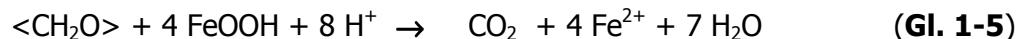
Neben Fe(III) liegt mit Sulfat ein weiterer potenzieller terminaler Elektronenakzeptor im Sediment von Restsee 77 vor. Wie bisherige Untersuchungen gezeigt haben, ist die mikrobielle Sulfatreduktion im Restsee 77 auf den Sedimentbereich mit erhöhtem pH-Wert beschränkt, wobei das Maximum der Sulfatreduktionsrate in etwa 8-10 cm Tiefe beobachtet wurde (PEINE ET AL. 2000). Im Einklang mit dieser Beobachtung konnten reduzierte

Schwefelverbindungen nur in den tieferen Sedimentschichten nachgewiesen werden. In den oberen Sedimentzonen mit pH 3 fehlten diese völlig (PEINE ET AL. 1999). Allerdings lagen die reduzierten Schwefelverbindungen in sehr geringen Konzentrationen vor. Setzt man die in Restsee 77 gemessene Sulfatreduktionsrate als konstant voraus, ergibt sich eine mittlere Akkumulationszeit von 10 Monaten für die gefundenen reduzierten Schwefelverbindungen. Dieser Widerspruch zum Alter des Restsees 77 von ca. 30 Jahren führt zu der Annahme, dass eine anaerobe Oxidation des bei der Sulfatreduktion entstehenden Sulfidschwefels in einem gekoppelten anorganisch/mikrobiologischen Prozess erfolgt (PEINE ET AL. 1999). Das Vorkommen von sulfatreduzierender Bakterien in sauren Grubenwässern und deren mögliche Bedeutung für Sanierungsmaßnahmen ist vielfach geschrieben (z. B. BENNER ET AL. 2000, FORTIN ET AL. 2000, WEBB ET AL. 1998), über Physiologie und Phylogenie ist bislang jedoch nur wenig bekannt (FORTIN ET AL. 1996, JOHNSON ET AL. 1993, TUTTLE ET AL. 1969A).

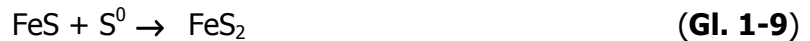
1.8 Die Kopplung von Eisen- und Schwefelkreislauf im Sediment

Entscheidend für die Entwicklung eines neutralen Gewässers ist die Balance zwischen den oxidativen, aziditätsbildenden Prozessen und den reduktiven, alkalinitätsbildenden Prozessen. In den durch saure Minenabwässer belasteten Gewässern trägt neben der mikrobiellen Sulfatreduktion (HERLIHY ET AL. 1987) auch die mikrobielle Fe(III)-Reduktion zur Alkalinitätsbildung bei (VILE UND WIEDER 1993).

Der Säureverbrauch bei der an die Fe(III)- oder Sulfat-Reduktion gekoppelten Oxidation organischen Materials (Summenformel $<\text{CH}_2\text{O}>$) lässt sich durch die Reaktionsgleichungen 1-5 und 1-6 beschreiben (ANDERSON UND SCHIFF 1987, COOK ET AL. 1986, MILLS ET AL. 1989), wobei die gebildeten Reaktionsprodukte H_2S und Fe^{2+} einer chemischen Reaktion zu unlöslichem Pyrrhothit unterliegen (Gl. 1-7). Pyrrhothit kann nicht durch Diffusionsprozesse in sauerstoffhaltige Bereiche gelangen, wodurch eine Rückoxidation erfolgen würde (ANDERSON UND SCHIFF 1987). Erst die Festlegung von Eisen und Schwefel ergibt einen Netto-Effekt (Gl. 1-8).

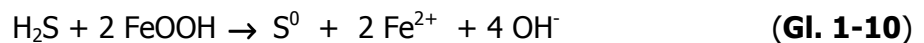


Neben Pyrrhotit kann eine Festlegung auch in Form von Pyrit (FeS_2) durch Bildung aus FeS und Schwefel erfolgen (BERNER 1984, LUTHER 1991).

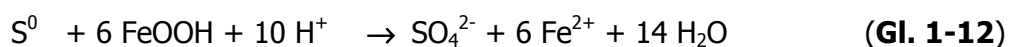
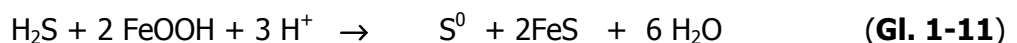


Allerdings ist die Entstehung von Pyrit unter anoxischen Bedingungen nur für Temperaturen über 100 °C nachgewiesen. Hierbei erfolgt eine Bildung von FeS_2 durch die Reaktion von FeS mit Schwefelwasserstoff unter Freisetzung von molekularem Wasserstoff (DROBNER ET AL. 1990).

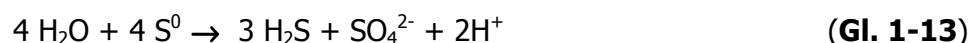
In der Anwesenheit von Fe(III)-Hydroxiden erfolgt nach allgemeiner Annahme eine Oxidation des bei der Sulfatreduktion gebildeten Sulfids auf rein chemischem Weg (Gl. 1-10). Zu dieser chemischen Oxidation finden sich in der Literatur viele Hinweise über mögliche Reaktionen von Sulfidschwefel mit verschiedenen Fe-Mineralen. Einige Untersuchungen gehen von einer hauptsächlichen Bildung von Sulfat und Thiosulfat aus (DOS SANTOS ALFONSO ET AL. 1992). Andere Ergebnisse gehen hingegen von einer Bildung von elementarem Schwefel oder Polysulfiden in einem pH-Bereich von 4–8 aus (PEIFFER 1994).



Die bei einer chemischen Reaktion gebildeten reduzierten Schwefelverbindungen können einer mikrobiellen Oxidation zu Sulfat unterliegen. Mikrobiell ist z.B. eine Oxidation von Sulfid, S^0 , oder anderer gelöster S-Verbindungen zu Sulfat, gekoppelt an die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) durch autotrophe azidophile Bakterien der Gattung *Acidithiobacillus* (BROCK UND GUSTAFSON 1976, JOHNSON 1995, LOVLEY UND PHILLIPS 1994) denkbar (Gl. 1-11, 1-12).



Daneben besteht die Möglichkeit der Disproportionierung von S^0 , Sulfit oder Thiosulfat zu Sulfat und Sulfid mit einer nachgelagerten chemischen Reaktion des gebildeten Sulfids mit Fe^{3+} (Gl. 1-13) (CANFIELD ET AL. 1992).



Die Disproportionierung von S^0 kann als Nebenreaktion durch sulfatreduzierende Bakterien (z. B. *Desulfovibrio sulfodismutans*; BAK 1987) oder auch ausschließlich durch chemolitho-autotrophe Bakterien wie *Desulfocapsa sulfoexigens* (FINSTER ET AL. 1998) durchgeführt werden. Mit der vollständigen Oxidation von Sulfid zu Sulfat ergeben sich pro Mol 8 freigesetzte Elektronen, wodurch sich theoretisch 8 Mol Fe(III) zu Fe(II) reduzieren lassen.

Erste Ergebnisse (PEINE ET AL. 2000) zeigten, dass das Verhältnis von freigesetztem Fe(II) zum gebildetem Sulfid im Bereich der maximalen Sulfatreduktion ca. 8,5 beträgt, was für eine Kopplung spricht und in Mikrokosmenversuche konnte eine Kopplung der Sulfidschwefeloxidation an die Fe(III)-Reduktion gezeigt werden (ROTH 2000).

1.9 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit war eingegliedert in das DFG-Projekt DFG KU 1367/1-2 „Kopplung der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen mit der Reduktion von Fe-Mineralen in anoxischen Sedimenten saurer Seen“. Die Untersuchungen wurden in einem Gemeinschaftsprojekt mit der Limnologischen Station der Universität Bayreuth in einem geochemischen Teilprojekt (Dipl. Geo. Winfrid Gade) und in einem mikrobiologischen Teilprojekt (vorliegende Arbeit) bearbeitet.

1.9.1 Hypothetisches Modell zum Fe-S-Kreislauf im Sediment von Restsee 77

Ein hypothetisches Modell zum Eisen- und Schwefelkreislauf zeigt Abbildung 1.2. Im Wasserkörper von Restsee 77 erfolgt eine überwiegend mikrobiell vermittelte Oxidation von Fe(II) zu Fe(III). Das Fe(III) unterliegt einer Hydrolyse. Unter den im See vorherrschenden abiotischen Bedingungen sedimentiert das gebildete Fe(III) als Schwertmannit ab, welches das dominierende Fe(III)-Mineral in der oberen Sedimentschicht (pH ~3) bildet. Mit zunehmender Sedimenttiefe kommt es mit ansteigendem pH-Wert (pH ~5-6) zur Umwandlung des Schwertmannits in Goethit. Eine mikrobielle Fe(III)-Reduktion erfolgt über die gesamte Sedimenttiefe. Das bei diesem Prozess gebildete Fe(II) gelangt durch Diffusionsprozesse in den Wasserkörper zurück, wo es unter oxischen Bedingungen wieder zu Fe(III) oxidiert wird. Die Sulfatreduktion ist nur auf den Sedimentbereich mit erhöhtem pH beschränkt. Das bei der Sulfatreduktion gebildete Sulfid unterliegt in einer Initialreaktion mit den in Überschuss vorhandenen Fe(III)-Mineralen einer Oxidation. Bei diesem rein chemischen Prozess kommt es zur Bildung von reduzierten Schwefelverbindungen, die einer mikrobiell vermittelten Oxidation zu Sulfat, gekoppelt an die Fe(III)-Reduktion, zur Verfügung stehen. Durch diesen Prozess kommt zu keiner dauerhaften Bildung von Eisenschwefelverbindungen.

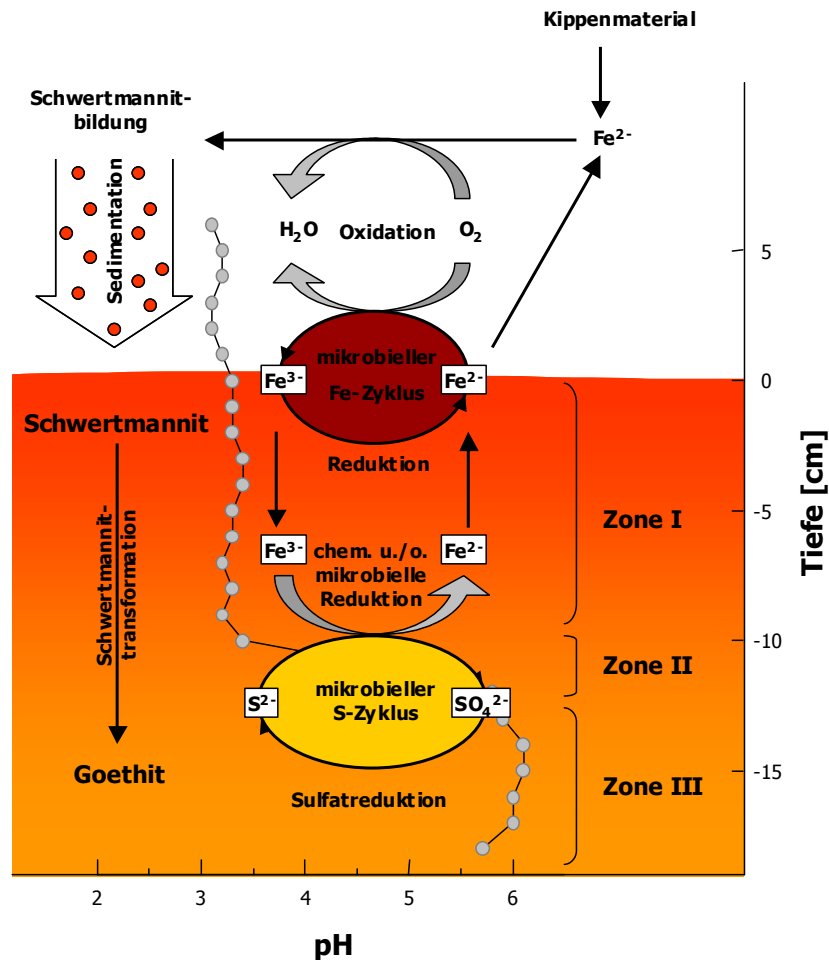


Abbildung 1.2 Hypothetisches Modell zum Fe-S-Kreislauf im Sediment von Restsee 77.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der biogeochemischen Prozesse in eisen- und sulfatreichen, aber kohlenstofflimitierten Sedimenten saurer Seen leisten sowie die an diesen Prozessen beteiligte Mikrobiota beschreiben. Die Untersuchungen wurden am Restsee 77 durchgeführt. Innerhalb des mikrobiologischen Teilprojektes wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen in Form von Laborexperimenten getestet:

I Die abiotischen Unterschiede im Sediment von Restsee 77 haben einen Einfluss auf die Diversität und Struktur der Mikrobiota.

Zur Untersuchung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Sediment wurde ein kultivierungsunabhängiger Ansatz gewählt. Hierzu wurde das Sediment in drei charakteristische Zonen unterteilt, die sich hauptsächlich durch den pH-Wert und einer anderen dominierenden Eisenspezies unterscheiden. Aus diesen drei Zonen wurde die DNA isoliert, die 16S rDNA mit allgemeinen Bakterienprimern amplifiziert und Klonbibliotheken sowie DGGE-*fingerprints* erstellt. Ein Vergleich der erstellten

fingerprints und Klonbibliotheken bietet die Möglichkeit, die in den unterschiedlichen Sedimentzonen vorkommenden Mikroorganismen zu identifizieren. Weiterhin ist ein Vergleich der Diversität und Struktur der Mikrobiota möglich. Neben der Fe(III)-reduzierenden Mikrobiota wurde auch die sulfatreduzierende Mikrobiota untersucht. Hierzu wurden die PCR-Produkte aus den unterschiedlichen Sedimentzonen mittels eines SRB-PhyloChips untersucht.

II Azidophile Bakterien sind an der Reduktion von Fe(III) auch unter schwach sauren Bedingungen beteiligt.

In Experimenten mit Reinkulturen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidobacterium capsulatum* wurde die Fähigkeit zur Reduktion von unterschiedlichen Fe(III)-Formen in einem pH-Bereich von 2-5 getestet. *A. ferrooxidans* wurde bisher in vielen kultivierungsabhängigen Untersuchungen an sauren Minenabwässern nachgewiesen (SOUTHAM UND BEVERIDGE 1992, FORTIN ET AL. 1996, MEIER 1999). Die Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion ist zwar vielfach beschrieben worden (BROCK UND GUSTAFSON 1976, DAS UND MISHRA 1996), jedoch liegen bisher keine Daten über das pH-Spektrum für diesen Organismus vor. Weiterhin wurde die Fe(III)-Reduktion an *A. capsulatum* getestet. Klonsequenzen aus dieser Gruppe wurden in den unterschiedlichsten Habitaten nachgewiesen, darunter auch in sauren Minenabwässern (HUGENHOLTZ ET AL. 1998). Eine Fe(III)-Reduktion durch diesen Organismus wurde bisher aber nicht untersucht.

III Der an die Fe(III)-Minerale sorbierte Kohlenstoff im sauren Sediment von Restsee 77 kann als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion dienen.

Aus Zonen I und III aus Restsee 77 wurde der organische Kohlenstoff extrahiert und in Mikrokosmen- sowie Anreicherungsexperimenten als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion verwendet. Aus den Anreicherungen wurden in einem weiteren Schritt Reinkulturen isoliert. Zusätzlich wurde der durch Dichtefraktionierung gewonnene Kohlenstoff aus Restsee 77 und Restsee 116, der an Fe(III)-Minerale sorbiert ist, zur Stimulierung Fe(III)-Reduktion verwendet.

IV Es kommt im Sediment zu einer an die Fe(III)-Reduktion gekoppelten mikrobiellen S-Oxidation.

Eine mikrobielle Kopplung der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen an die Fe(III)-Reduktion wurde in Mikrokosmenexperimenten untersucht. Hierzu wurden unterschiedlich reduzierte Schwefelverbindungen zu Mikrokosmen der Zone I und Zone III zugesetzt und der Einfluss auf die Fe(II)-Bildung ermittelt. Die ausgewählten reduzierten Schwefelverbindungen sollten den Reaktionsprodukten aus der chemischen Reaktion von Sulfid (aus der Sulfatreduktion) mit Fe(III)-Mineralen unter sauren pH-Bedingungen entsprechen. Hierfür waren speziell die Ergebnisse aus dem geochemischen Teilprojekt wichtig. Die für die Kopplung des Schwefel- und Eisenkreislaufs verantwortlichen Prozesse wurden an Anreicherungskulturen sowie an einem Isolat untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Lage des Untersuchungsgebietes

Der untersuchte Restsee 77 des ehemaligen Braunkohletagebaus Grünewalde liegt im Südwesten des Lausitzer Braunkohlereviers westlich der Stadt Lauchhammer. Die Sedimentproben für die Untersuchungen wurden aus dem Restsee 77 in der Lausitz bei Grünewalde entnommen. Restsee 77 gehört zu einer Seenkette, die durch Gräben untereinander verbunden ist.

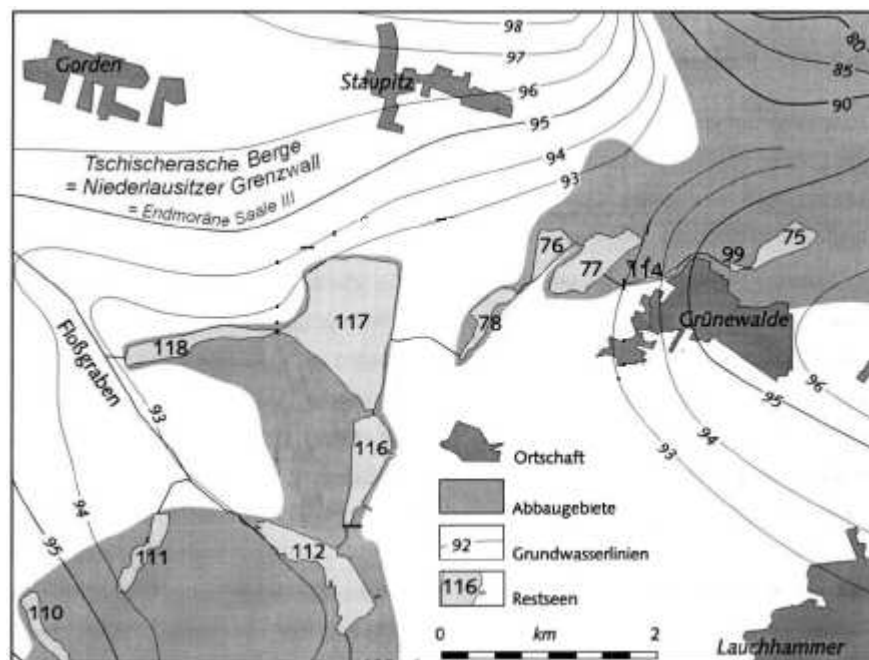


Abbildung 2.1 Lage des untersuchten Restsee 77 und der Restseenkette in der Nähe von Lauchhammer, Lausitz (verändert nach PEINE 1998).

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 Probennahme

Die Entnahme der Sedimentproben erfolgte im Bereich der tiefsten Stelle (zwischen 6,9 und 7,5 m) von einem Boot mittels Sedimentstecher (Mondseecorer der Firma Uwitec, Mondsee, Österreich). Bei diesem System wird mittels Fallgewicht ein durchsichtiges PVC-Roh (\varnothing 6 cm, Länge 100 cm) ins Sediment gedrückt. Über einen Auslösemechanismus wird eine Verschlussvorrichtung über ein zuvor gespanntes Gummiband vor die untere Öffnung der Kunststoffröhre gezogen. Auf diese Art konnten Sedimentkerne gezogen werden, ohne ihre

natürliche Schichtung zu zerstören. Es wurden nur solche Sedimentkerne verwendet, deren Schichtung nach optischer Begutachtung ungestört waren, die also keine Gaseinschlüsse enthielten und an denen die Schichtung deutlich zu erkennen war. Sedimentkerne, die diesem Kriterium nicht entsprachen, wurden verworfen. Die ungestörten Sedimentkerne wurden an beiden Enden mit einem Gummistopfen verschlossen, in aufrechter Lage in einer Kühlbox ins Labor transportiert und über Nacht bei 2°C gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte unmittelbar am nächsten Tag. Charakteristische Sedimentkerne, wie sie aus Restsee 77 erhalten wurden, zeigt Abbildung 2.2.

2.2.2 Aufbereitung der gezogenen Sedimentkerne

Nach der optischen Ansprache der Sedimentkerne im Labor wurden die einzelnen Kerne in IV Zonen unterteilt. Charakteristisch für die einzelnen Zonen war neben der Färbung insbesondere der pH-Wert. Diese beiden Parameter wurden für die Unterscheidung herangezogen. Die einzelnen Zonen der Kerne wurden mit einem Sedimentschneider abgetrennt und in sterile und mit Stickstoff gespülte 0,5 L Infusionsflaschen (Merck, ABS, Dietikon, Schweiz) gefüllt. Das Material einer Zone aus allen Kernen wurde dabei gemischt.

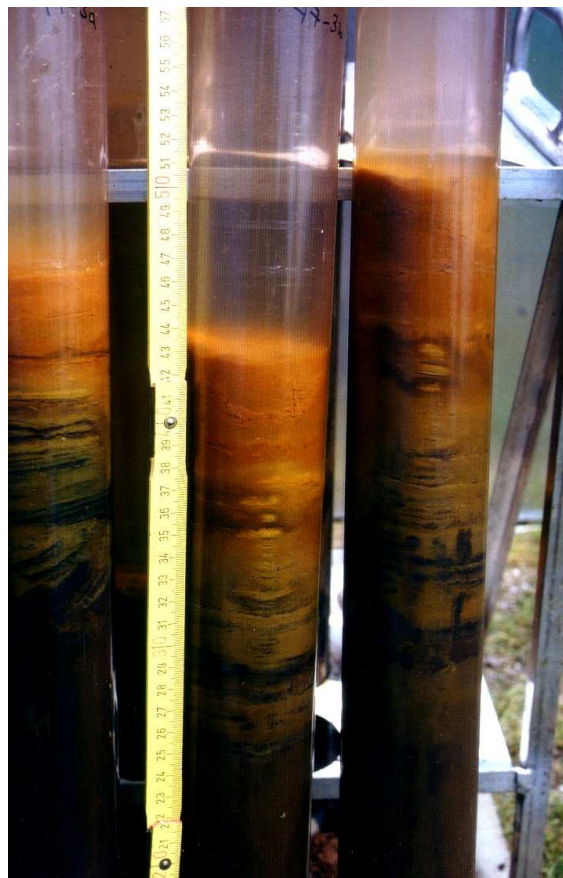


Abbildung 2.2 Einzelne Sedimentkerne aus Restsee 77 mit der gut zu erkennenden Schichtung des Sediments.

Nach jeder Befüllung der Flaschen mit Material wurden diese gasdicht verschlossen und für 10 min. steril mit Stickstoff begast. Das so gepoolte Sedimentmaterial wurde für Mikrokosmenexperimente und als Ausgangsmaterial für Kultivierungsversuche, MPN-Ansätze und für die Huminstoff-Extraktion (siehe 2.2.3) verwendet.

Zusätzlich wurden zwei einzelne Sedimentkerne in Schichten von 1,5 cm geschnitten und das Sedimentmaterial in sterile 125 ml MK-Serumflaschen (Merck, ABS, Dietikon, Schweiz) gefüllt und 5 min. steril mit Stickstoff begast. An diesen Sedimentproben erfolgte neben der Bestimmung von pH, Sulfat- und Fe(II)-Konzentration eine Bestimmung der Zellzahl/ml über DAPI-Färbung und die Detektion von Acidobakterien mittels FISH (siehe hierzu auch 2.3.4).

2.2.3 Extraktion von Huminstoffen aus Zone I und Zone III in Restsee 77

Die Extraktion der Huminstoffe erfolgte in Anlehnung an ein Extraktionsprotokoll von ALMENDROS UND DORADO (1999). Das Prinzip beruht hierbei auf der Grundlage, dass Huminstoffe bei pH-Werten unter 2 nicht mehr löslich sind. Für die Extraktion wurden aus den Zonen I und Zone III jeweils 100 g Sediment mit sterilem deionisierten H₂O (Seralpur Pro 90 CN, Seral Erich Alhäuser, Ransbach-Baumbach, Deutschland) auf ca. 750 ml aufgefüllt. Der pH der Suspensionen wurde mit einer 5 N NaOH auf pH 8 eingestellt und unter ständigem Rühren im Dunkeln für 24 h bei 2°C inkubiert. Das Sediment wurde abzentrifugiert (10 min., 5.000 rpm), der Überstand mit den Huminstoffen dekantiert und im Dunkeln aufbewahrt. Das Sediment wurde erneut in ca. 500 ml H₂O_{demin.} resuspendiert und der pH mit 5 N NaOH auf pH 8 eingestellt. Die Suspension wurde für 4 h im Dunkeln bei 2°C unter ständigem Rühren inkubiert. Das Sediment wurde erneut abzentrifugiert (10 min., 5.000 rpm) und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Der pH dieser huminstoffhaltigen Lösung wurde mit einer 5 N HCl auf pH 2 eingestellt. Hierbei kam es bereits nach wenigen Minuten zu einer Ausflockung. Diese Lösung wurde bei 2°C für 4 h im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde für 20 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet dreimal mit H₂O_{demin.} gespült. Das Pellet wurde mit ca. 50 ml H₂O_{demin.} überschichtet und der pH mit 2 N NaOH auf pH 6 unter ständigem Rühren und im Dunkeln eingestellt. Hierbei kam es zu einer langsamen Auflösung des Pellets. Während dieser Zeit wurde der pH kontrolliert und notfalls mit NaOH oder HCl auf 6 eingestellt. Nach der kompletten Resuspendierung des Huminstoffpellets wurde die Lösung unter anoxischen Bedingungen in 100 ml Serumflaschen (CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) sterilfiltriert. Eine Analyse der Huminstoffe erfolgte durch Dr. Elke Zwirnmann von der Limnologischen Station in Potsdam. Eine Beschreibung der Analysemethode und der einzelnen Fraktionen erfolgt unter 6.2.

Durch diese Extraktion wurden nicht nur die bereits gelösten Huminstoffe, sondern auch die an die Fe(III)-Minerale gebundenen gelöst. Dies konnte vor allem am Sedimentmaterial aus der Zone III beobachtet werden, da es hier zu einer deutlichen Entfärbung der Fe(III)-Minerale kam. Da die so hergestellten Extrakte nicht nur die bereits im Porenwasser gelösten, sondern auch die an den Fe(III)-Mineralen gebundenen Huminstoffe enthielten, werden diese Lösungen im weiteren Verlauf der Arbeit als "Extrakt-Lösung" bezeichnet, um eine mögliche Verwechslung mit dem Begriff DOC (dissolved organic carbon) zu vermeiden, mit dem die im Porenwasser gelösten organischen Verbindungen erfasst werden.

2.2.4 Herstellung steriler Stammlösungen

Die unten aufgeführten Mengen der entsprechenden Substanzen wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ aufgelöst, in einem Messkolben auf 50 bzw. 100 ml aufgefüllt, in 120 ml Serumflaschen sterilfiltriert und steril mit Argon für 15 min. begast.

1 M Thiosulfat-Lösung:	7,9 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ auf 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$.
224 mM Na-Sulfid-Lösung:	5 g $\text{Na}_2\text{S} \times 7-9 \text{ H}_2\text{O}$ und 1,8 g NaHCO_3 in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$. Durch Zugabe einer sterilen 2 M HCl wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde unter Stickstoffstrom in eine 120 ml-Serumflasche sterilfiltriert.
1 M $\text{S}^0_{\text{flowbale}}$ -Lösung:	60 ml Flowable Sulfur ($\text{S}^0_{\text{flowbale}}$; Stoller Chemical Company, Inc. Houston Texas, USA) wurden in 60 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ suspendiert und 5 min. bei 500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen und der Zentrifugationsschritt dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 60 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ aufgenommen und in einer 120 ml-Serumflasche mit Argon für 30 min. begast. Die Endkonzentration betrug 1 M.

2.2.5 Kolorimetrische Quantifizierung unterschiedlicher Eisen- und Schwefelspezies

Alle Messungen wurden am Kontron UNIKON 930 Spectrophotometer (Kontron Instruments, München, Deutschland) durchgeführt.

2.2.5.1 Bestimmung der Fe(II)-Freisetzung

Die Messung von Fe(II) erfolgte photometrisch mit der Phenanthrolin-Methode (TAMURA ET AL. 1974). Mit dieser Methode wird nur lösliches Fe(II) erfasst. Durch eine vorherige HCl-Extraktion (mit Lösung 3) kann auch das Fe(II) aus Fe(II)/Fe(III)-Mischkristallen erfasst werden. Zur Kalibrierung der Messmethode wurden Standards aus Fe(II)-Chlorid-Tetrahydrat im Bereich von 0 bis 1000 $\mu\text{mol l}^{-1}$ anoxisch angesetzt.

Folgende Lösungen wurde verwendet:

- Lösung 1: 0,5%-ige Phenanthrolin-Lösung: 0,5 g 1,10-Phenanthroliniumchlorid-Monohydrat in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ lösen.
- Lösung 2: Acetatpuffer (pH $\sim 4,5$): 200 g Ammoniumacetat in ca. 80 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ lösen; langsame Zugabe von 250 ml Eisessig unter ständigem Rühren; mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 500 ml auffüllen
- Lösung 3: 0,5 N HCl: 41 ml 37%-ige HCl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 1 L auffüllen.

2.2.5.1.1 Gesamtes Fe(II) [$\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$]

Mit sterilen und Argon-gespülten Spritzen wurden 0,2 ml Probe steril entnommen und mit 9,8 ml Lösung 3 verdünnt (1:50). Nach 1 h wurden zu 4,5 ml dieser Verdünnung 0,5 ml der Lösung 1 und 0,5 ml Lösung 2 gegeben und gut durchmischt. Die Probe wurde anschließend gefiltert und die Extinktion bei 512 nm gemessen. Lag die Extinktion außerhalb der Kalibrierung, wurde die 1:50 Verdünnung in einem weiteren Schritt 1:10 oder 1:100 mit Lösung 3 verdünnt.

2.2.5.1.2 Lösliches Fe(II) [$\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$]

Mit sterilen und Argon-gespülten Spritzen wurden 0,2 ml Probe steril entnommen und mit 9,8 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ 1:50 verdünnt. Nach kurzem Durchmischen wurden zu 4,5 ml dieser Verdünnung 0,5 ml der Lösung 1 und 0,5 ml der Lösung 2 gegeben. Die Messung erfolgt wie für $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ beschrieben.

2.2.5.2 Bestimmung von unterschiedlichen Schwefelverbindungen

Nachfolgend werden die Methoden zur Bestimmung von Sulfid, Thiosulfat, Sulfat, elementarem Schwefel sowie TRIS ("totale reduced inorganic sulfur") und AVS ("acidic volatile sulfur") beschrieben.

2.2.5.2.1 Bestimmung von Sulfid

Die Bestimmung von Sulfid erfolgte über die Methylenblaumethode (FREVERT 1983). Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Lösung 1: 2% Zinkacetat-Lösung

Lösung 2: 2 g Dimethyl-p-phenyldiaminhydrochlorid wurden in ca. 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gelöst und nach der Zugabe von 200 ml H_2SO_4 (95-97%) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 1 L aufgefüllt. Diese Lösung wurde im Dunkeln bei 2°C gelagert.

Lösung 3: 50 g $\text{NH}_4[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}]$ wurden in 10 ml H_2SO_4 gelöst und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 500 ml aufgefüllt.

Für die Messung wurden 10 ml Lösung 1 in einem 100 ml Messkolben vorgelegt und die Probe zugegeben. Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ wurde auf ca. 80 ml aufgefüllt, 10 ml Lösung 2 zugesetzt, geschüttelt und 10 min. bei RT inkubiert. Für die Farbbildung wurden 0,5 ml Lösung 3 zugegeben und nach kräftigem Schütteln mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 100 ml aufgefüllt. Nach 1 h wurde die Extinktion bei 665 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Sulfid-Standard in einem Konzentrationsbereich von 2 μM -60 μM .

2.2.5.2.2 Bestimmung von elementarem Schwefel

Die Bestimmung des elementaren Schwefels erfolgte nach BARTLETT UND SKOOG (1954). Folgende Reagenzien wurden benötigt:

Lösung 1: Aceton-Lösung (19 Teile Aceton + 1 Teil $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$)

Lösung 2: KCN-Lösung (0,1% (w/v) KCN in Aceton-Lösung). Die Lösung wurde im Dunkeln bei 2°C gelagert. Sie war nur wenige Tage haltbar.

Lösung 3: Fe-Lösung (0,4% (w/v) FeCl_3 in Aceton-Lösung): Diese Lösung muss 24 h im Dunkeln inkubiert werden. Dabei bildet sich ein Präzipitat. Für die Messung wird nur der Überstand verwendet.

Lösung 4: Schwefel-Lösung (10,7 mM): 34,2 mg elementarer Schwefel wurden in 100 ml Aceton über Nacht gelöst. Von dieser Lösung wurde eine Eichreihe (0,01-0,3 mM) erstellt.

Die entnommene Probe (0,5-1 ml) wurde unter anaeroben Bedingungen mit 4 ml Aceton versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Hiervon wurde 0,5-1 ml mit 6 ml Lösung 2 versetzt, 5 min. inkubiert und anschließend mit Lösung 1 auf 10 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 2 ml mit 2 ml aus Lösung 3 gemischt und die Extinktion bei 470 nm gemessen. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Zugabe von Lösung 3. Die Kalibrierung erfolgte mit in Aceton gelöstem Schwefel in einem Konzentrationsbereich von 50 μM - 500 μM .

2.2.5.2.3 Bestimmung von Thiosulfat

Für die Bestimmung von Thiosulfat nach KELLY ET AL. (1994) wurden folgende Reagenzien verwendet:

Lösung 1: Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4):

Lösung 2: 1,63 g KCN in 250 ml H₂O_{demin.} (0,1 M).

Lösung 3: 2,5 g CuSO₄ x 5 H₂O in 100 ml H₂O_{demin.} (0,1 M).

Lösung 4: 1,5 M Fe(NO₃)₃-Lösung in 4 N Perchlorsäure: 303 g Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O werden unter ständigem Rühren in 217 ml 72%ige Perchlorsäure und 10 20 ml H₂O_{demin.} über Nacht gelöst und mit H₂O_{demin.} auf 500 ml aufgefüllt.

Die Probe (0,2–1 ml) wurde mit 1,6 ml Phosphatpuffer und 2 ml KCN-Lösung versetzt. Nach 10 min. Inkubation wurden 0,6 ml CuSO₄-Lösung zugegeben und 10 min. inkubiert. Danach wurden 1,2 ml Fe(NO₃)₃-Lösung zugegeben, mit H₂O_{demin.} auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 460 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Thiosulfat-Standard in einem Konzentrationsbereich von 50 µM - 500 µM.

2.2.5.2.4 Bestimmung von Sulfat

Die Sulfatbestimmung erfolgte mit der Barium-Methode (TABATABAI 1974). Hierzu wurden folgende Reagenzien verwendet:

Lösung 1: Barium-Gelantine-Reagenz: 0,5 g Gelantine wurden in 200 ml H₂O_{demin.} unter Erhitzen gelöst. Nach einer Standzeit von 6 h bei 4°C erfolgte die Zugabe von 8 g BaCl₂.

Lösung 2: 0,5 N HCl

Die Proben zur Sulfatbestimmung (1 ml) wurden mittels Einwegspritzen steril entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 3 min. bei 14.000 rpm (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,2 ml mit 9,8 ml H₂O_{demin.} verdünnt. Nach der Zugabe von 0,5 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2 wurde die Probe geschüttelt und für 1 h inkubiert. Die Trübungsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 420 nm. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Sulfat-Standard in einem Konzentrationsbereich von 50 µM - 500 µM.

2.2.5.2.5 Bestimmung von TRIS und AVS

Die Bestimmung von TRIS und AVS erfolgte nach ULRICH ET AL. (1997). Der gesamte anorganische Schwefel wurde mittels eines Chromaufschlusses durchgeführt. Hiermit werden elementarer Schwefel, FeS₂, FeS und Thiosulfat erfasst.

In einer Anaerobenkammer (Mecaplex, Grenchen, Schweiz) wurde die Probe in einer 120 ml-Serumflasche mit 8 ml 0,5 M Cr^{2+} -Lösung, 4 ml 6 N HCl und 4 ml Methanol versetzt und gasdicht verschlossen. Im Inneren der Serumflaschen befand sich ein Glasröhrchen mit 2,5 ml einer 10%igen Zink-Acetat-Lösung. In diesem Röhrchen wurde das sich entwickelnde H_2S aufgefangen und nach 24 h mit der Methylenblau-Methode (siehe 2.2.5.2.1) bestimmt. Die AVS-Bestimmung erfolgte ähnlich der Bestimmung von TRIS, allerdings wurde hierbei die Cr^{2+} -Lösung weggelassen. Daher können bei der AVS-Bestimmung nur FeS und H_2S erfasst werden.

Die für den Chromaufschluss benötigte Cr^{2+} -Lösung wurde über die chemische Reduktion einer 1 M Cr(III)Cl_2 -Lösung (gelöst in 0,5 M HCl) mittels amalgmiertem Zink hergestellt. Hierfür wurde 100 ml Zinkgranulat (0,5 Maschenweite) mit 1 M HCl versetzt, nach 1 min. dekantiert und das Zinkgranulat mit 0,25 M Quecksilberchlorid-Lösung bedeckt. Nach 3 min. wurde kräftig gerührt und abermals dekantiert. Das amalgmierte Zink wurde zwei bis dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen und in eine Säule gefüllt. Die Säule wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ soweit aufgefüllt, dass das amalgmierte Zink ca. 2 cm bedeckt war. Nach jeder Benutzung erfolgte eine Regenerierung des Säulenmaterials mittels einer anoxischen 6 N HCl.

2.2.6 pH-Messung

Die pH-Messung erfolgte mit einem pH-Meter (Model pH 252, WTW, Weilheim, Deutschland) und einer pH-Elektrode (W247-87/110, Ingold-Messtechnik, Urdorf, Schweiz) die mit Eichlösungen zwischen pH 4 und pH 7 geeicht wurde. Die pH-Messung am Sediment erfolgte immer an unverdünnten Proben, welche zur Messung immer sterile und über Argon-gespülte Einwegspritzen entnommen wurden.

2.2.7 Bestimmung von Organischen Verbindungen mittels HPLC

Die Bestimmung von Glukose, Acetat, Laktat und Citrat erfolgte am Hochleistungsflüssigkeitschromatographen 1090L (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Kalifornien, USA). Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine Aminex HPX Säule (300 x 7,8 mm, BioRad, Richmond, Kalifornien, USA). Als Detektor diente ein Refraktationsindexdetektor (1047A, Hewlett-Packard Co.). Die Signale wurden über einen Schreiber mit integriertem Integrator (3396 Serie 2, Hewlett-Packard Co.) aufgezeichnet und ausgewertet. Eine Quantifizierung der Substanzen erfolgte über externe Standards. Die Analyse (Probenvolumen 20 μl) erfolgte bei einer Ofentemperatur von 60°C und einer Flussrate von 0,8 ml min^{-1} . Als Eluent diente eine entgaste 0,01 N Phosphorsäure.

Die Proben (1 ml) wurden mittels Einwegspritzen steril entnommen und für 10 min. bei 13.000 U min⁻¹ abzentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf). Der Überstand wurde über 0,2-Porenfilter in Chromatographievials filtriert und mit gasdichten Septen verschlossen.

2.2.8 Statistische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, handelt es sich bei den in den folgenden Abbildungen gezeigten Messwerten um Mittelwerte, die aus jeweils drei parallelen Ansätzen berechnet wurden. Die Fehlerbalken entsprechen \pm der Standardabweichung. Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (σ^2) wurden nach folgender Formel berechnet (PRECHT 1982).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \qquad \sigma^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}}{n-1}}$$

Sofern nicht anders erwähnt, stellen in den nachfolgenden Abbildungen die wiedergegebenen Messwerte einen Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen dar. Die ebenso dargestellten Fehlerbalken entsprechen \pm der Standardabweichung.

2.2.9 Rarefaction-Analyse

Die Rarefaction-Methode wurde erstmals von SANDERS (1968) beschrieben und später von HURLBERT (1971) und SIMBERLOFF (1972) korrigiert. Diese Methode erlaubt den Vergleich der Artenvielfalt in zwei Datenbanken, die sich in der Größe der Datensätze unterscheiden. Eine größere Anzahl an gesammelten Individuen lässt auf eine höhere Anzahl an unterschiedlichen Arten schließen. Somit ist ein Vergleich der Artenvielfalt in zwei Datenbanken mit unterschiedlich großen Datensätzen nicht ohne weiteres möglich. Um dennoch einen Vergleich zu ermöglichen, wird die Anzahl an unterschiedlichen Arten n in der kleineren Datenbank ermittelt. Bei der Rarefaction-Analyse werden dann wiederholt aus der größeren Datenbank n Proben gezogen. Aus diesen theoretischen Probenahmen wird die durchschnittliche Anzahl an unterschiedlichen Arten sowie die Varianz und die Standardabweichung berechnet. Dies ermöglicht es, die erstellten Datenbanken daraufhin zu vergleichen, ob diese sich in der gefundenen Anzahl an unterschiedlichen Arten signifikant unterscheiden. Die für die Berechnung benötigte Software wurde unter der Internet-Adresse www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php bezogen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus dem Sediment

Für die Extraktion der DNA wurden 10 ml Sedimentmaterial mit steriler 5 N NaOH auf pH 9,0 einstellen, mit TRIS-Puffer (1 M, pH 8,0) 1:1 verdünnt und mit 5 g säuregewaschene und bei 400°C gebackenen Zirkoniumpartikel versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines „Bead Beaters“ (BioSpec Inc., Bartlesville, Ok., USA) für 4 x 1 min. Zwischen den Pausen wurde die Sedimentsuspension für 1 min. in ein Eisbad (2°C) abgekühlt. Nach dem Aufschluss wurde das Sediment für 10 min. bei 4°C abzentrifugiert (Beckmann Zentrifuge, Typ J2-HS, 18.000 rpm, JA-20 Rotor), anschließend wurde der Überstand in ein steriles Zentrifugenröhrchen geben und mit 1 Teil eiskaltem Isopropanol versetzen. Die DNA wurde über Nacht bei -20°C gefällt. Nach erneutem zentrifugieren (10 min. bei 18.000 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 4 ml TE-Puffer (pH 8,0, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA) aufgenommen, mit 1 Volumenteil Phenol (mit TE-Puffer auf pH 8,0 equilibriert) versetzt und von Hand gemischt. Die Lösung wurde bei 18.000 rpm für 15 min. zentrifugieren und die wässrige Phase mit 2 Teilen Chloroform:Isoamylalkohol ausschütteln und erneut für 10 min. bei 18.000 rpm zentrifugieren.

Die DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1 Teil eiskaltem Isopropanol und Inkubation bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die Lösung wurde für 10 min. bei 18.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 4 ml TE-Puffer (pH 8,0, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA) aufnehmen und 2,3 ml 7,5 M Ammoniumacetat und 260 µl Ethidiumbromid versetzt. Es folgte eine 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur und im Dunkeln.

Es folgte eine Zugabe von 5 ml Phenol (mit TE-Puffer auf pH 8,0 equilibriert) und vorsichtiges mischen von Hand. Durch zentrifugieren für 10 min. bei 18.000 rpm wurde die Phenolphase von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 1 Teil eiskaltem Isopropanol bei -20°C für 4 h inkubieren und anschließend für 10 min. bei 18.000 rpm zentrifugieren. Das erhaltenen Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer aufnehmen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 PCR-Amplifikation der 16S rDNA.

Die universellen Bakterien-Primer GM3 und GM4 (für die Übersicht der Primer siehe Tabelle 2-1) wurden für die Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA aus Zone I und Zone III verwendet. Die PCR-Reaktion erfolgte im GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) mit folgenden Spezifikationen:

- 20 pmol Primer
- 200 µM Nukleotid-Mix

- 300 µg Rinderserumalbumin
- 1 x PCR Puffer
- 1 U Taq DNA Polymerase (Eppendorf)

Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Die Template-DNA (4 µl) wurde erst nach einem Vorheizen auf 70°C zugesetzt (Hot-Start). Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt.:

- 30 Zyklen bei 95°C für 60 sek.
- 42°C für 60 sek.
- 72°C für 90 sek.
- 7 min. für Abschlusszyklus

Bei Verwendung der spezifischeren Primer-Sets (siehe Tabelle 2-1) für *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus*, *Geobacter*, *Geothrix* und *Shewanella* sowie den Primern GM5-clamp und 907RM für die DGGE wurde die Annealingtemperatur auf 55°C eingestellt.

2.3.3 Klonierung

Die Ligation und Transformation wurde mit dem Promega-Kit pGEM®-T Vector System II (Promega, Heidelberg, Deutschland) nach beiliegender Anleitung durchgeführt.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl im Sediment mittels DAPI-Färbung und „Fluoreszens *in situ* Hybridisierung“ (FISH)

2.3.4.1 Fixierung der Zellen

Ein Sedimentkern wurde unter sterilen Bedingungen in 1,5 cm Scheiben geschnitten, das erhaltene Material in sterile 125 MK Serumflaschen überführt und für 10 min. mit Stickstoff begast. Von diesen Proben wurde 1 ml steril mit einer Spritze entnommen, in ein 50 ml Nalgene-Röhrchen (Nalgene Nunc International Corporation, Rochester, USA) überführt und zur Fixierung mit sterilfiltriertem 4% Paraformaldehyd vierfach verdünnt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die fixierten Proben wurden mit sterilfiltriertem (0,2 µm, Millipore, Bedford, USA) 1 x PBS-Puffer (130 mM NaCl; 10 mM NaP_i, pH 7.4) 1:500 verdünnt, homogenisiert und für 30 min. im Ultraschallbad bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 2.1

Verwendete Primer zur Amplifizierung der 16S rDNA unterschiedlicher Bakteriengruppen.

Gruppenspezifität	Primer	Nukleotidesequenz (5' → 3')							16S rDNA- Position	Amplikon -Größe	Literatur
Bacteria	GM3	AGA	GTT	TGA	TCM	TGG	C		08 - 23	1499	[1]
	GM4	TAC	CTT	GTT	ACG	ACT	T		1507 - 1492		
	GM5-clamp ^a	CCT	ACG	GGA	GGC	AGC	AG		341 - 357	585	[2]
	907RM	CCG	TCA	ATT	CMT	TTG	AGT	TT	926 - 907		
<i>Acidiphilium</i>	Acido594F	ACA	GTC	AGG	CGT	GAA	ATT	CCT	594 - 615	585	[3,4]
	Acido1150R	AGA	GTG	CCC	ACC	CAA	ACA	T	1150 - 1132		
'Bio-Leaching' assoziierte Bakterien	Ferro458F	GGG	TTC	TAA	TAC	AAT	CTG	CT	458 - 477	1015	[3]
	Ferro1473R	TAC	CGT	GGT	AAC	CGC	CCT		1473 - 1456		
<i>Geobacter</i>	GM3	AGA	GTT	TGA	TCM	TGG	C		8 - 23	556	[1,5]
	Geo825R	TAC	CCG	CRA	CAC	CTA	GT		825 - 809		
	Gb564F	AGC	GTT	GTT	CGG	AWT	TAT		564 - 581	726	[6]
	Gb1290R	CAA	TCC	GAA	CTG	AGA	CCG	GC	1290 - 1271		
<i>Geothrix</i>	Gx182F	AGA	CCT	TCG	GCT	GGG	ATG	CT	182 - 201	1015	[5]
	Gx472R	AGG	TAC	CGT	CAA	GTA	ACA	SS	472 - 453		
<i>Shewanella</i>	Shw783F	AAA	GAC	TGA	CGC	TCA	KGC	A	783 - 801	462	[5]
	Shw1245R	TTY	GCA	ACC	CTC	TGT	ACT		1245 - 1228		
Acidobacterium	Acido	GAT	CCT	GGC	TCA	GAA	TC		15 - 31	1492	[7,1]
	GM4	TAC	CTT	GTT		ACT	T		1507 - 1492		

^a Primer wurde mit einer GC-Klammer (CGC CCG CCG GCG CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCC G) am 5'-Ende verwendet. [1] MUZYER ET AL. 1995 [2] MUZYER ET AL. 1998 [3] DE WULF-DURAND ET AL. 1997 [4] GOEBEL UND STACKERANDT 1994 [5] SNOEYENBOS-WEST ET AL. 2000 [6] COATES UND ACHENBACHER 2002 [7] BARNS ET AL. 1999

2.3.4.2 DAPI-Färbung

0,5 ml der fixierten Proben wurden mit 5 µl einer 100 µg/ml konzentrierten DAPI-Lösung (4',6-Diamino-2-Phenylindole) und 0,5 ml 1 x PBS-Puffer versetzt und 15 min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Probe wurde anschließend auf einen schwarzen Polycarbonat-Filter (0,2 µm; Millipore GTBP 047000) filtriert und mit 10-20 ml sterilfiltriertem (0,2 µm) H₂O_{demin.} gespült. Zum Auszählen der Zellen wurde der Filter mit einer Schere geviertelt, ein Teil auf einen Objektträger gebracht und mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA), einem Antibleichmittel, bedeckt. Die Auszählung erfolgte am Epifluoreszenz-Mikroskop Axioskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer Hochdruckquecksilberlampe (50 W) und dem Filter-Set 02 (Zeiss; G365, FT395, LP420). Die Zählung erfolgte bei einer Vergrößerung von x1000.

2.3.4.3 FISH

Die mit Paraformaldehyd fixierten Proben wurden pelletiert und 2x mit PBS gewaschen und in Ethanol/PBS (1:1) bei 20°C aufbewahrt. Von diesen fixierten Proben wurden 3 µl auf einen vorbereiteten Objektträger gebracht und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger in 50%igem (v/v), dann in 80%igem (v/v) und in 99%igem (v/v) Ethanol transferiert, um die aufgebrauchten Zellen zu dehydratisieren. Die Objektträger wurden mit 1%iger HCl gewaschen, mit 70%igem Ethanol nachgespült und in eine wässrige Lösung aus 0,1% (w/v) Gelatine und 0,01% (w/v) CrK(SO₄)₂ bei 70°C getaucht. Die so behandelten Objektträger wurden aufrecht zum Trocknen aufbewahrt. 2 µl eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sondenmix' (IRog1 und IRog2 1:1; LUDWIG ET AL. 1997) (50 ng/µl; MWG) wurden zu 8 µl Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,01% (w/v) SDS; 35% (v/v) Formamid) gegeben. Die fixierten und dehydratisierten Proben wurden mit 9 µl Hybridisierungspuffer überschichtet und für 2 h bei 46°C in geschlossenen und sterilen Nunc-Serumröhrchen inkubiert. Nach vorsichtigem Spülen mit ca. 10 ml Waschpuffer (0,01% (w/v) SDS; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA, pH 8,0; 80 mM NaCl) wurden die Objektträger je 2x in 50 ml Waschpuffer für jeweils 15 min. für 48°C inkubiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte wie die Auszählung der DAPI-Zählung unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop.

2.3.5 DGGE-fingerprinting

Für den 16Sr DNA-*fingerprint* wurde die Roh-DNA aus allen drei Zonen mit den universellen Bakterien-Primern GM5-clamp und 907RM amplifiziert. Bei der PCR für das DGGE-*fingerprinting* wurde auf Nukleotide von der Firma Molecular Probes (Molecular Probes, Hamburg, Deutschland) zurückgegriffen, da sich bei der Verwendung von Nukleotiden

anderer Hersteller keine scharfen Banden ergaben. Die DGGE wurde mit dem D-Code System der Firma Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 0.75 mm dickes 7% Polyacrylamid-Gel in 1 x TAE (40 mM Tris-Acetat [pH 7.4], 20 mM Natrium-Acetate, 1 mM EDTA) geladen. Der denaturierende Gradient wurde auf 40 - 60% eingestellt (100% sind equivalent zu 7 M Harnstoff und 40% [vol/vol] Formamid). Das DGGE-Gel wurde bei 60°C und 100 V für 18 h betrieben.

2.3.6 'Verdünnungs-PCR'

Die relative Verteilung von Vertretern bekannter Fe(III)-reduzierender Gruppen wurde über eine so genannte 'Verdünnungs-PCR' untersucht. Hierzu wurde eine modifizierte MPN-PCR (PICARD ET AL. 1992) durchgeführt. Da aufgrund der schwierigen Verhältnisse nur sehr wenig DNA aus dem Sediment extrahiert werden konnte, wurde die von PICARD ET AL. (1992) beschriebene MPN-PCR dahingehend abgeändert, dass statt 3 Parallele PCR-Reaktionen pro Primer-Set und Verdünnungsstufe nur eine PCR-Reaktion durchgeführt wurde.

Die aus Zone I, II und III extrahierte Roh-DNA wurde auf ca. 10 µg/µl mit H₂O_{demin.} eingestellt. Diese Roh-DNA wurde sowohl unverdünnt (10 µg/µl) als auch in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (10^0 - 10^{-4}) mit den spezifischen Primern für die Gruppen *Acidiphilium*, "Bioleaching-Assoziierte-Bakterien", *Acidobacterium*, *Geobacteraceae*, *Geothrix* und *Shewanella* amplifiziert.

2.3.7 Erstellung einer allgemeinen Klonbibliothek mit universellen Bakterien-Primern

Die PCR-Produkte aus Zone I und Zone III mit den allgemeinen Bakterienprimer-Sets GM3/GM4 und GM5-Clamp/907RM für die 16Sr DNA wurden mit dem Cloning-Kit von Promega (Promega, Heidelberg) in den pGEM®-T Vektor kloniert und in *Escherichia coli* JM109 vermehrt. Die genaue Vorgehensweise erfolgte dabei dem beiliegenden Handbuch. Erfolgreich rekombinant transformierte Klone wurden über das Blue/White-Screening identifiziert. In einem ersten Schritt wurden die Plasmide aus den Klonen durch Auflösen in 20 µl Cracking Puffer (0.1 M NaOH; 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 1% SDS) extrahiert und auf die richtige Größe (ca. 4.5 kb) in einem 1% Agarose-Gel getestet. Klone mit der richtigen Plasmidgröße von ca. 4,5 kb wurden als positiv angesehen und für das weitere Klon-Screening verwendet. Hierzu wurde das Plasmid als Template in eine PCR-Reaktion mit den Primern GM5/907RM verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1,5% Agarose-Gel gescreent. PCR-Produkte mit einer Größe von 450 bp wurden als positiv bewertet. Für das Durchsuchen der Klonbibliotheken nach redundanten 16Sr DNA-Sequenzen wurden nur diese Klone berücksichtigt. Das finale Durchsuchen der Klonbibliotheken aus den

PCR-Produkten mit dem Primer-Set GM3/GM4 erfolgte mittels einer abgewandelten DGGE-Methode (LIU ET AL. 2002). Mit dieser Methode ist es möglich bis zu 200 Klone in einem DGGE-Gel zu untersuchen. Die allgemeine Klonbibliothek aus den PCR-Produkten mit dem Primer-Set GM5-Clamp/907RM wurde über RFLP-Screening (siehe 2.3.8) nach redundanten Klonen durchsucht. Die so als unterschiedlich identifizierten Klone wurden für die nachfolgende Sequenzierung bei der Firma MWG (Molecular WG, Ebersbach, Deutschland) mit dem Plasmid-Kit von Promega aufgereinigt.

2.3.8 Erstellung einer Klonbibliothek mit spezifischen Primern für Fe(III)-Reduzierern

Für die spezifischen Klonbibliotheken wurden die PCR-Produkte der unverdünnten Roh-DNA aus Zone I und Zone III mit den spezifischen Primern kloniert. Die Klonierung erfolgt dabei in der gleichen Weise wie bei der allgemeinen Klonbibliothek. Bei diesen Klonbibliotheken erfolgte ein Screening nach redundanten Klonen über RFLP. Hierzu wurde das Plasmid-Insert mit dem entsprechenden Primer-Set reamplifiziert und die Größe des Amplifikats in einem 1,5% Agarose-Gel überprüft. Die Amplifikate mit der erwarteten Größe wurden mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Hierzu wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 U HaeIII (Promega) und 1 U CfoI (Promega) bei 35°C für 2 h verdaut. Die Auftrennung erfolgte über ein Polyacrylamid-Gel (7% wt/vol; 1 X TAE-Puffer) bei 100 V für 3,5 h und RT mit dem D-Code™ System (BioRad, München, Deutschland). Die sich ergebenden RFLP-Muster wurden miteinander verglichen. Klone, bei denen sich das gleiche RFLP-Muster ergab, wurden zu einer OTU ("operational taxonomic unite") zusammen gefasst.

2.3.9 Klonbibliotheken und Sequenzanalyse

Die erhaltenen 16S rDNA Sequenzen wurden auf chimäre Anteile über das Programm CHECK_CHIMERA geprüft (<http://geta.life.uiuc.edu/RDP/commands/chimera.html>). Chimäre Sequenzen wurden verworfen. Weiterhin wurden ähnliche Sequenzen in den Datenbanken von EMBL und dem Ribosomal Database Project (RDP) gesucht. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit dem ARB-Programm.

Der Deckungsgrad der einzelnen Klonbibliotheken wurde mit nachfolgender Formel berechnet (SINGLETON ET AL. 2001):

$$C_x = 1 - (N_x/n).$$

N_x ist hierbei die Anzahl der unterschiedlichen Sequenzen, OTU's oder RFLP-Muster und n ist die Gesamtzahl der gescreenten Klone. Ein Vergleich der Klonbibliotheken erfolgte mittels Rarefaction-Analyse (siehe 2.2.9).

2.3.10 PhyloChip-Analyse

Für die Analyse der sulfatreduzierenden Bakterien im Sediment wurde mit der extrahierten Roh-DNA aus den Zonen I, II und III eine PCR in zwei Parallelen angesetzt. Als Primer wurden GM3 und GM4 verwendet. Die erhaltenen PCR-Ansätze (jeweils 50 µl) aus den Zonen I, II und III wurden vereinigt und über den PCR-Cleaning-Kit von Promega aufgereinigt. Die Analyse mittels PhyloChip wurde von Dr. Alexander Loy an der TU München unternommen. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich bei LOY ET AL. (2002). Die Sequenz der verwendeten Sonden sowie weitere Informationen finden sich auch auf Web-Seite von probeBase (<http://www.probebase.net>; LOY ET AL. 2003).

2.4 Kultivierungsabhängige Untersuchungen

2.4.1 Herstellung verschiedener Fe(III)-Festphasen und des löslichen Fe(III)

Nachfolgend erfolgt die Beschreibung zur Herstellung von unterschiedlichen Eisenfestphasen. Alle hergestellten Eisenfestphasen wurden in wenig $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ bis zum Gebrauch bei 2°C im Dunkeln gelagert. Für die einzelnen Medien wurden die Eisenfestphasen mit Thio-Medium oder TSB-Medium soweit aufgefüllt, dass sich eine Konzentration von 40 mM ergab.

Amorphes $\text{Fe}(\text{OH})_3$:

10,8 g $\text{Fe}(\text{III})\text{Cl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden in ca. 40 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gelöst und mit einer 0,5 N NaOH langsam auf pH 7 titriert. Bei diesem Vorgang wechselt die Färbung der Lösung von dunkelgelb und klar zu dunkelbraun und trüb (LOVLEY UND PHILLIPS 1986A). Diese Lösung wurde anschließend insgesamt $4 \times$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen. Hierzu wurde jeweils 20 min. bei 5000 U min^{-1} zentrifugiert (J2-HS, Beckmann Instruments Inc. , Palo Alto, Kalifornien, USA), der Überstand dekantiert und das Pellet in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ resuspendiert. Kam es bei diesem Schritt zu einer klaren rotbräunlichen Verfärbung des Überstandes, musste der pH erneut auf pH 7 eingesellt werden. Das Pellet wurde in wenig $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ resuspendiert und mit Medium auf 1 L aufgefüllt, was einer ungefähren Endkonzentration von 40 mM Fe(III) entspricht.

Schwertmannit_{autokl.}:

10 g $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4$ wurde in 1 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gelöst und 0,5-1 ml einer Wasserstoffperoxid-Lösung zugesetzt. Der pH der Lösung wurde auf 2-4 eingestellt. Direkt nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid kam es zur Ausfällung eines rötlichen Niederschlags. Der Ansatz wurde über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das pelletierte Eisenmineral $3 \times$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gewaschen. Das so hergestellte Eisenmineral aus 3 Ansätzen wurde vereinigt und mit Medium auf 1 L aufgefüllt, was eine Fe(III)-Konzentration von ca. 40 mM ergab. Das

fertige Medium wurde in Serumflaschen oder Bellco-Röhrchen anoxisch abgefüllt und autoklaviert. In allen Versuchen, in den autoklaviertes Medium mit Schwertmannit verwendet wurde, wird die Bezeichnung "Schwertmannit_{autokl.}" verwendet.

Schwertmannit_{sterilf.}:

Die Herstellung von "sterilfiltriertem" Schwertmannit (wird nachfolgend nur noch als Schwertmannit_{sterilf.} bezeichnet) erfolgte wie für Schwertmannit_{autokl.} beschrieben. Hierbei wurden allerdings vorab alle Lösungen in sterile Glasgefäße sterilfiltriert sowie alle Glasgeräte oder Zentrifugenbecher autoklaviert bzw. mit 96% Ethanol gespülten. Das fertige Medium wurde anschließend unter sterilen Bedingungen anoxisch in sterile Serumflaschen oder Bellco-Röhrchen abgefüllt und mit sterilen Butyl-Stopfen verschlossen.

Goethit:

180 ml 5 M KOH wurden zu 100 ml 1 M Fe(III)(NO₃)₃ zugegeben, mit H₂O_{demin.} auf 2 L aufgefüllt und in Steilbrustflaschen bei 70°C für 60 h im Trockenschrank aufbewahrt (CORNELL UND SCHWERTMANN 1996). Nach viermaligem Waschen (siehe amorphes Fe(OH)₃) wurde die Lösung mit Medium auf 2,5 L aufgefüllt, was eine Endkonzentration von ca. 40 mM Fe(III) ergab.

Fe(III)₂(SO₄)₃-Stammlösung:

9,99 g Fe(III)₂(SO₄)₃ wurden in ca. 20 ml H₂O_{demin.} gelöst und mit 10 N NaOH auf einen pH von 1,7 titriert. Die Lösung wurde auf 50 ml aufgefüllt und über einen 0,2 µm Porenfilter in eine sterile 100 ml-Serumflasche sterilfiltriert. Die Flasche wurde steril mit Argon begast und ein Überdruck eingestellt. Die Endkonzentration dieser Lösung betrug 500 mM.

2.4.2 Flüssigmedien für MPN-Studien, Anreicherungs- und Reinkultur-Experimente

Alle verwendeten Kulturmedien bis auf Medium 70 (Tabelle 2.5), wurden anoxisch hergestellt. Hierzu wurde jeweils 1 L H₂O_{demin.} aufgekocht, mit den in Tabelle 2.2 bis Tabelle 2.4 angegebenen Mengen an Substanzen sowie der entsprechenden Menge Fe-Mineral (40 mM Endkonzentration) versetzt und auf Eis abgekühlt. Aufkochen und Abkühlen erfolgte unter kontinuierlicher N₂-Begasung. Der pH wurde mittels 0,5 N NaOH oder 0,5 N HCl auf 3 oder 5 eingestellt. Vom Medium wurden jeweils 9 ml mittels Hungate-Technik in Bellco-Röhrchen abgefüllt, mit Stopfen aus Butyl-Gummi und Aluminium-Kappen verschlossen und anschließend bei 121°C für 15 min. autoklaviert.

Tabelle 2.2 TSB-Medium

In 1000 ml H ₂ O _{demin.}	
TSB	1,37 g

Tabelle 2.3 Thio-Medium

In 1000 ml H ₂ O _{demin.}	
(NH ₄)SO ₄	13,2 g
K ₂ HPO ₄	4,1 g
MgSO ₄	46,2 g
CaCl ₂ x H ₂ O	0,9 g
KCl	5,2 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,1 g
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	0,05 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,05 g
Na ₂ SeO ₄ x 10 H ₂ O	0,1 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g

Tabelle 2.4 Acido-Medium

In 1000 ml H ₂ O _{demin.}	
(NH ₄)SO ₄	2,0 g
KCl	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g

Tabelle 2.5 Medium 70

In 1000 ml H ₂ O _{demin.}	
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	33,3 g
pH mit 0,1 N H ₂ SO ₄ auf 1,4 eingestellt	

2.4.2.1 Fe(III)-Pyrophosphat-Medium (FePP_i-Medium)

30 g Fe(III)-Pyrophosphat wurden in ca. 900 ml entgastem Thio-Medium gelöst und der pH mittels einer 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 3 bzw. 5 eingestellt. Das Medium wurde mit entgastem Thio-Medium auf 1000 ml aufgefüllt und anoxisch unter N₂-Begasung in Belco-Tubes abgefüllt und autoklaviert.

2.4.2.2 FeCitrat-Medium

10 g FeCitrat wurden in ca. 900 ml entgastem Thio-Medium gelöst und der pH mittels einer 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 3 bzw. 5 eingestellt. Das Medium wurde mit entgastem Thio-Medium auf 1000 ml aufgefüllt und anoxisch unter N₂-Begasung in Belco-Tubes abgefüllt und autoklaviert.

2.4.3 Festmedien für Anreicherungskulturen und Tiefagar-Verdünnungsreihen

Für Agar-Platten wurden drei Lösungen getrennt angesetzt:

- Lösung 1: 500 ml Thio-Medium mit doppelter Menge an Fe(III)-Mineral wurden anaerob angesetzt und autoklaviert.
- Lösung 2: 500 ml 3%ige Agar-Lösung in Thio-Medium wurden anaerob angesetzt und autoklaviert.

Der pH der Lösungen 1 bis 2 wurde mittels 0,5 N HCl oder 0,5 N NaOH vor dem Autoklavieren um 0,5 pH-Einheiten höher als gewünscht eingestellt, da durch das Autoklavieren der pH um ca. 0,5 Einheiten absank.

Allen Lösungen wurden nach dem autoklavieren auf ca. 90°C abgekühlt und in die Anaerobenkammer eingeschleust. Dort wurden für die Herstellung von Agar-Platten Lösung 1 und Lösung 2 gemischt und in die vorbereiteten Petrischalen gegossen. Die Agar-Platten wurden über Nacht in der Anaerobenkammer zum Trocknen stehen gelassen.

Für den Tiefagar-Verdünnungsreihen (WIDDEL UND BAK 1992) wurden die Lösungen 1 und 2 ebenfalls in der Anaerobenkammer gemischt, von der dann jeweils 10 ml in Bellco-Röhrchen (18 x 150 mm; Bellco Glass Inc., Vineland, N.Y., USA) abgefüllt und in ein Wasserbad mit 45 - 50°C gestellt. Die Röhrchen wurden inokuliert, mit sterilen Butyl-Stopfen und Aluminium-Kappen verschlossen und auf Eis gestellt. Nach ca. 10 min. wurden die Röhrchen bei 15°C im Dunkel inkubiert. Vor dem Mischen von Lösung 1 und 2 wurde Lösung 2 mit Na₂S oder Thiosulfat versetzt. Die zugegebene Menge wurde so berechnet, das sich nach dem Mischen der zwei Lösungen für Thiosulfat 10 mM und für Na₂S 5 mM einstellten.

2.4.4 Mikrokosmenexperimente

Von dem gepoolten Material der einzelnen Zonen aus den Sedimentkernen wurden in der Anaerobenkammer (100%-ige N₂-Atmosphäre) jeweils 40 g in sterile 150 ml-Infusionsflaschen (Merck, ABS, Dietikon, Schweiz) abgefüllt. Die Flaschen wurden in einer Anaerobenkammer mit Schraubkappen und Butyl-Gummistopfen gasdicht verschlossen. Nach dem Ausschleusen erfolgte ein steriler Austausch der Stickstoffgasphase gegen Argon und die Einstellung eines Überdrucks von 200 mbar. Die Entnahme von Proben oder die Zugabe von Substanzen (z.B. S⁰_{flowable}, Na₂S, Acetat oder Huminstofflösung) sowie CO₂ erfolgte über sterile und Argon-gespülte Einwegspritzen. Sämtliche Ansätze wurden, soweit nicht anders erwähnt, in drei Parallelen angesetzt. Alle Mikrokosmen wurden bei 15°C stehend im Dunkeln inkubiert. Mit diesen Ansätzen wurde der Einfluss folgender Parameter auf die Eisen- oder Sulfatreduktion in Zone I und Zone III untersucht:

- unterschiedliche pH-Werte	Eisenreduktion
- Huminstoffe	Eisenreduktion
- reduzierte Schwefelverbindungen	Eisenreduktion
- Acetat	Sulfatreduktion

2.4.5 MPN-Ansätze

Die Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl pro ml Sediment erfolgte mit der MPN-Methode. Diese beruht auf der Feststellung der An- oder Abwesenheit von Mikroorganismen in Aliquoten mehrerer Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Materials (z.B. Boden, Sediment, Wasserproben) (ALEF 1991). Die Verdünnungsreihen werden in mehreren Parallelen angesetzt und aus einer originären Verdünnungsreihe mit einem einheitlichen Volumen angeimpft. Auf Grundlage der spezifischen biochemischen Leistungen der Organismen (Substratspektrum, pH-Spektrum, Abbauprodukte, etc.) werden die Kulturröhrchen als positiv oder negativ bewertet. Negativ bewertete Röhrchen haben keine lebensfähige Zellen mit der gewünschten Eigenschaft erhalten. Mit Wahrscheinlichkeitstabellen lässt sich aus der Zahl positiver und negativer Parallelröhrchen bestimmter Verdünnungsstufen die wahrscheinlichste Zahl (MPN) ermittelt. Durch die Anwendung selektiver Bedingungen lässt sich so die MPN einer bestimmten Organismengruppe ermitteln.

Mit der MPN-Methode wurde die MPN-Zahl für huminstoffverwertende Fe(III)-Reduzierer bestimmt. Hierzu wurde Sedimentmaterial aus den Zonen I, II, III und IV in drei Parallelen von 10^0 bis 10^8 verdünnt (40 mM Fe(III)-Mineral, pH 3 und 5, 1 ml Extrakt-Lösung). Aus den höchsten positiven Verdünnungsstufen dieses MPN-Ansatzes wurden Anreicherungskulturen angelegt. Als Kontrolle dienten zwei vergleichbare Verdünnungsansätze. Ein Ansatz wurde zwar angeimpft, erhielt jedoch keine Extrakt-Lösung. Der andere Ansatz erhielt nur Extrakt-Lösung, aber kein Sediment als Inokulum.

2.4.6 Experimente mit den Reinkulturen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 583 und *Acidobacterium capsulatum* DSM 11244

Reinkulturen von *A. ferrooxidans* und *A. capsulatum* wurden von der DSMZ in Braunschweig erworben. An diesen Reinkulturen wurden Experimente zur Reduktion unterschiedlicher Fe(III)-Quellen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die Experimente mit *A. ferrooxidans* wurden in Thio-Medium bei pH 3, 4 und 5 mit den Fe(III)-Mineralen Schwertmannit_{autokl.}, Schwertmannit_{sterilf.}, Fe(OH)₃ und Goethit (jeweils 40 mM) bei 30°C durchgeführt. Die Versuchesansätze wurde aus einer Vorkultur mit 1 ml angeimpft. Die Vorkultur wurden in Medium 70 (pH 1,4) für drei Wochen oxisch bei 30°C angezogen, die

Zellen unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert und in 1 ml Thio-Medium aufgenommen. Die OD wurde durch sterile Zugabe von Thio-Medium auf 0,3 eingestellt.

Die Experimente mit *A. capsulatum* wurden in den Medien Acido-Medium, FePP_i- sowie FeCitrat-Medium bei den pH-Werten 3 und 5 durchgeführt. Das Acido-Medium enthielt jeweils 40 mM Goethit oder Fe(OH)₃. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Die Versuchsansätze wurden aus einer oxisch angezogenen Vorkultur (30°C, 10 mM Glukose, pH 3) mit jeweils 1 ml angeimpft. Die Vorkultur wurde nach zwei Wochen abzentrifugiert, dreimal in Acido-Medium gewaschen und die optische Dichte (OD) auf ca. 0,4 eingestellt. Die OD wurde bei 660 nm in einem Spectronic 501 Photometer (Bausch & Lomb Inc., Rochester, N.Y., USA) direkt in Bellco-Röhrchen bestimmt. Als Referenz diente unbeimpftes Medium.

2.4.7 Anreicherungskulturen

Zwei Anreicherungskulturen (in dieser Arbeit mit MB1 und MB2 bezeichnet) wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Ursula Roth (ROTH 2000) im November 1999 angesetzt. Die originalen Anreicherungskulturen wurden für die vorliegende Arbeit im November 2000 übernommen. Die Ansetzung erfolgte über Verdünnungsreihen (bis Stufe 10⁻⁸) mit einem Thio-Medium mit Fe(OH)₃ als Fe-Quelle bei pH 3 und pH 5 angelegt. Na₂S (4,8 mM) und CO₂ (5 mM) wurden als Elektronendonator bzw. Kohlenstoffquelle verwendet.

Zum Erhalt der Anreicherungskulturen wurden diese in neues Medium transferiert. In diesen fortlaufenden Transfers wurde die Fe(II)_{ges.}-Konzentration bestimmt und die Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsraten errechnet.

Neben diesen zwei Anreicherungskulturen wurden eigene Anreicherungen angesetzt. Über Verdünnungsreihen (10⁰ bis 10³) wurden Anreicherungskulturen angelegt, die die Oxidation von elementarem Schwefel an die Reduktion von Fe(III) unter sauren pH-Bedingungen koppelt.

2.4.8 Untersuchungen zum Schwefelumsatz in den Anreicherungskulturen

In den Anreicherungen erfolgte eine Untersuchung des Schwefelumsatzes. Hierzu wurden 60 ml-Serumflaschen mit 50 ml Medium (Thio-Medium, 40 mM Fe(III)-Mineral, pH 3 und pH 5) 10%ig angeimpft. Die Ansätze wurden bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Mit sterilen Argon-gespülten Einwegspritzen wurden Proben für pH, Sulfat, S⁰, Thiosulfat, TRIS, AVS und Fe(II)_{ges.} gezogen.

2.4.9 Untersuchungen zum Einfluss von Huminstoffen auf die Fe(III)-Reduktion

In den Anreicherungskulturen mit Huminstoffen als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion wurde neben $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ auch die Änderung in der Zusammensetzung der Huminstofflösung untersucht. Hierzu wurden zu Versuchsende aus den Ansätzen mit der höchsten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration die Huminstoffe wie unter beschrieben extrahiert.

Für diese Experimente wurden 60 ml-Serumflaschen mit 50 ml Medium (Thio-Medium, 40 mM Fe(OH)_3 bei pH 5) 10%ig angeimpft. Die Ansätze wurden bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte mit sterilen und Argon-gespülten Einwegspritzen.

2.5 Chemikalien und Gase

Alle verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merk (Darmstadt, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Invitrogen (Hamburg, Deutschland). Alle verwendeten Gase wurden von der Firma Rießner (Lichtenfels, Deutschland) bezogen.

3 Ergebnisse

Hypothese I: Die abiotischen Unterschiede im Sediment von Restsee 77 haben einen Einfluss auf die Diversität und Struktur der Mikrobiota.

Zur Bearbeitung dieser Hypothese wurden in einem ersten Schritt der Verlauf einiger chemischer Parameter sowie die Zellzahl/ml mit zunehmender Tiefe im Sediment bestimmt. Aus Voruntersuchungen (PEINE ET AL. 2000) ist bekannt, dass im Sediment von Restsee 77 der pH-Wert ein dominierender Faktor ist. Daher sollte der Einfluss von unterschiedlichen pH-Werten auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment in Mikrokosmenexperimenten untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss des pH-Wertes auf die mikrobielle Diversität und Struktur in den einzelnen Sedimentzonen über unterschiedliche kultivierungsunabhängige Ansätze wie DGGE-fingerprint, Erstellung von Klonbibliotheken aus den Zonen I und III sowie über eine Analyse der sulfatreduzierenden Mikrobiota durch die Anwendung eines PhyloChip erfasst werden.

3.1 Beschreibung der Sedimentfestphase von Restsee 77

Fünf Sedimentkerne (Probenahme vom 28.11.2001) wurden zur Charakterisierung einer optischen Ansprache unterzogen. Die Sedimentkerne ließen sich in 4 Zonen unterteilen, die sich zum einen durch den pH, zum anderen durch eine unterschiedliche Färbung deutlich unterscheiden ließen. Die gemittelten Ergebnisse der fünf Sedimentkerne sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Als Zone I wurde der Tiefenbereich zwischen 0 und 6-8 cm mit einem pH-Wert zwischen 2,8 und 3,1 definiert. Die bräunlich orange Färbung ergab sich aus dem Eisenmineral Schwertmannit, welches in dieser Zone das dominierende Eisenmineral darstellt (siehe auch ROTH 2000, PEINE ET AL. 2000). Zone II (6-10 cm) zeigte im Vergleich zu Zone I keinen stabilen pH-Wert. In Zone III lagen die gemessenen pH-Werte zwischen 3,4 und 4,7. Dieser Bereich zeigte eine gelblich braune Färbung, was auf den hier dominierenden Goethit zurückzuführen ist. In der sich anschließenden Zone III kam es zu einem weiteren Anstieg im pH auf 5,2-5,7. Hier wies das Sediment eine beginnende olivgrüne Verfärbung mit eingezogenen schwarzen Streifen auf. Zone IV war bräunlich schwarz in der Färbung und enthielt Teile von Braunkohle. Hier lag der pH im Bereich von 5,3-6,1.

Mit zunehmender Sedimenttiefe stieg das Trockengewicht. In Zone I lag das Trockengewicht im Mittel bei 8 Gew.%. Der größte Wert konnte in Zone IV mit im Mittel 36 Gew.% bestimmt werden.

Tabelle 3.1 Klassifizierung des Sediments aus Restsee 77 ^{a)}.

Zone	Obere Horizont-grenze (cm)	Untere Horizont-grenze (cm)	Beschreibung	pH	mittleres Trockengewicht (Gew. %)
I	0	6-8	Bräunlich orange (7YR 6/8)	2,8-3,1	8,2
II	6-8	8-10	Gelblich braun (10YR 6/6)	3,4-4,7	14,6
III	8-10	14-16	olivgrün, mit schwarzen Streifen (10YR6/10)	5,2-5,7	22,4
IV	14-16	30-43 ^{b)}	bräunlich schwarz, Kohlestücke (2,5YR 3/1)	5,3-6,1	36,3

^{a)} Die Beschreibung bezieht sich auf 5 Kerne der tiefsten Stelle vom 28.11.2001.

^{b)} Die untere Horizontgrenze von Zone IV war durch die Eindringtiefe des Sedimentkernstechers begrenzt.

3.2 Fe(II)_{ges.}-Freisetzung im Sediment

In Mikrokosmen mit Material aus den Sedimentzonen I und III des Restsees 77 (Probenahme vom 28.11.2001) konnte eine Fe(II)_{ges.}-Freisetzung über eine Zeitspanne von 70 Tagen beobachtet werden (Abbildung 3.1). Zu Versuchsbeginn lag die Fe(II)_{ges.}-Konzentration in Zone I im Mittel bei 10,6 mM und in Zone III bei 52,4 mM. In Zone I konnte in den ersten 8 Tagen keine Veränderung in der Fe(II)_{ges.}-Konzentration gemessen werden. Ab diesem Zeitpunkt kam es zu einer Zunahme in der Fe(II)_{ges.}-Konzentration mit einer Rate von 595 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Die Fe(II)_{ges.}-Konzentration lag zum Versuchsende im Durchschnitt bei 37,3 mM.

Tabelle 3.2 Vergleich der auf das Frischgewicht und das Trockengewicht bezogenen Freisetzungsraten von Fe(II)_{ges.} in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III des Sedimentes von Restsee 77.

Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsraten ^{a)}				
	$\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$	<math>\mu\text{mol gFG}^{-1} \text{d}^{-1} \text{ ^{b)}</math>	<math>\mu\text{mol gTG}^{-1} \text{d}^{-1} \text{ ^{c)}</math>	pH
Zone I	595	536	6,47	3,1
Zone III	1405	1048	4,68	5,3

^{a)} Die Bestimmung der Freisetzungsraten erfolgte ausschließlich am linearen Teilbereich der ermittelten Kurven. Die 8 bzw. 13 tägige lag-Phase wurde bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

^{b)} FG = Feuchtgewicht

^{c)} TG = Trockengewicht

In den Zone III-Mikrokosmen war die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration im Vergleich zu den Zone I-Mikrokosmen über eine Zeitspanne von 13 Tagen relativ konstant. Ab diesem Zeitpunkt stieg die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration mit einer Rate von $1405 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ an. Nach 60 Tagen konnte keine weitere Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration beobachtet werden. Ein Vergleich der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten weist für Zone III eine ca. 3fach höhere Rate aus (Tabelle 3.2). Werden die ermittelten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten auf das Trockengewicht bezogen, zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Dann liegt die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates in Zone I mit $6,47 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ über der in Zone III mit $4,68 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

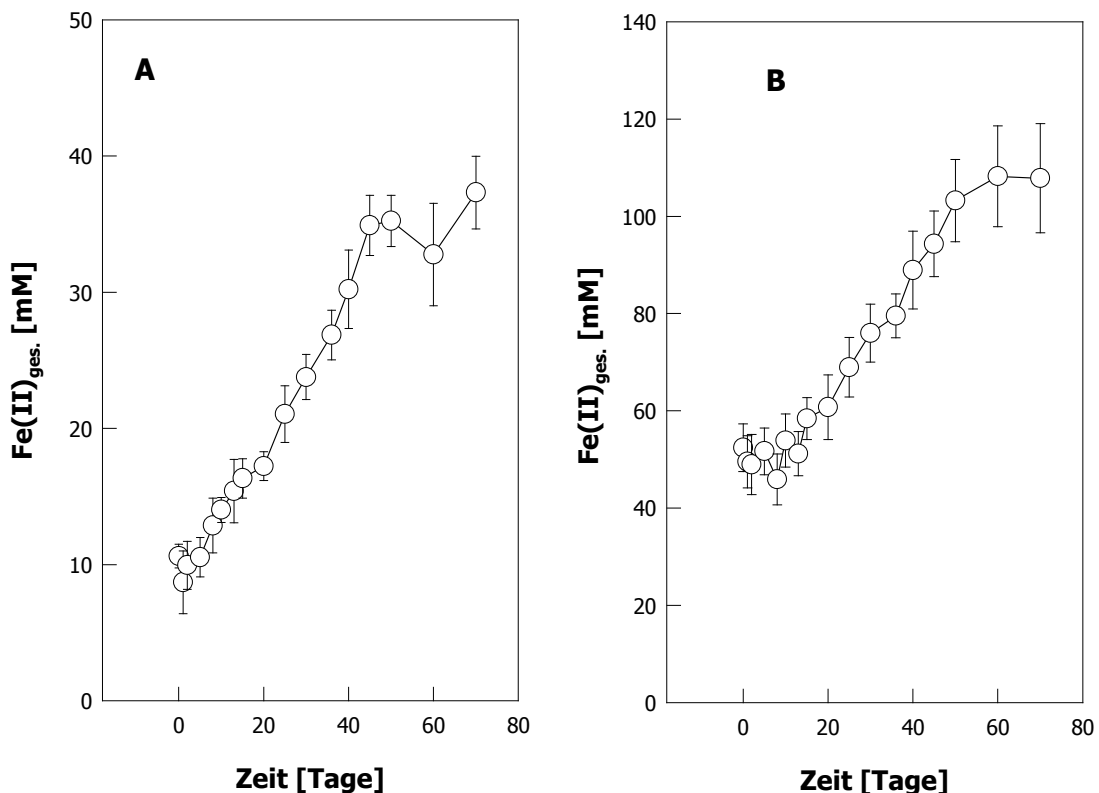


Abbildung 3.1 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung (○) in Mikrokosmen aus Zone I (**A**) und Zone III (**B**) des Sediments von Restsee 77. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus jeweils drei Parallelansätzen.

3.3 Effekt unterschiedlicher pH-Werte auf die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III des Sediments

In den Mikrokosmen (Probenahme vom 15.07.2003) aus Zone I setzte beim *in situ* pH von 2,9 eine sofortige $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung ein. Eine lag-Phase wie in den Mikrokosmen vom 28.11.2001 (siehe 3.2) konnte nicht beobachtet werden. Über die gesamte Versuchszeitspanne von 22 Tagen erfolgte hier eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung mit einer Rate von $710 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Abbildung 3.2). Insgesamt stieg hierbei die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration von

7,7 mM ($\pm 0,91$) auf 23,3 mM ($\pm 3,80$). Wurde der pH in Zone I auf den in Zone III gemessenen pH-Wert von 5,3 eingestellt, kam es erst mit einer Verzögerung von 5 Tagen zu einer $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates lag bei pH 5,3 mit $1554 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ um den Faktor 2,2 höher als beim Original-pH. In den Mikrokosmen der Zone III konnte im Vergleich zum ursprünglichen pH von 5,3 durch die Absenkung auf pH 2,9 kein Effekt beobachtet werden. Unter beiden pH-Bedingungen setzte eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung nach 5 Tagen ein. Zum Versuchsende konnte zwar bei den gemessenen $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, jedoch wiesen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates bei pH 5,3 mit $895 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und bei pH 2,9 mit $557 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ einen Unterschied um den Faktor 1,6 auf. Eine Verlängerung der Versuchsdauer hätte hier möglicherweise einen Effekt des pH auf die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Zone III deutlicher hervortreten lassen.

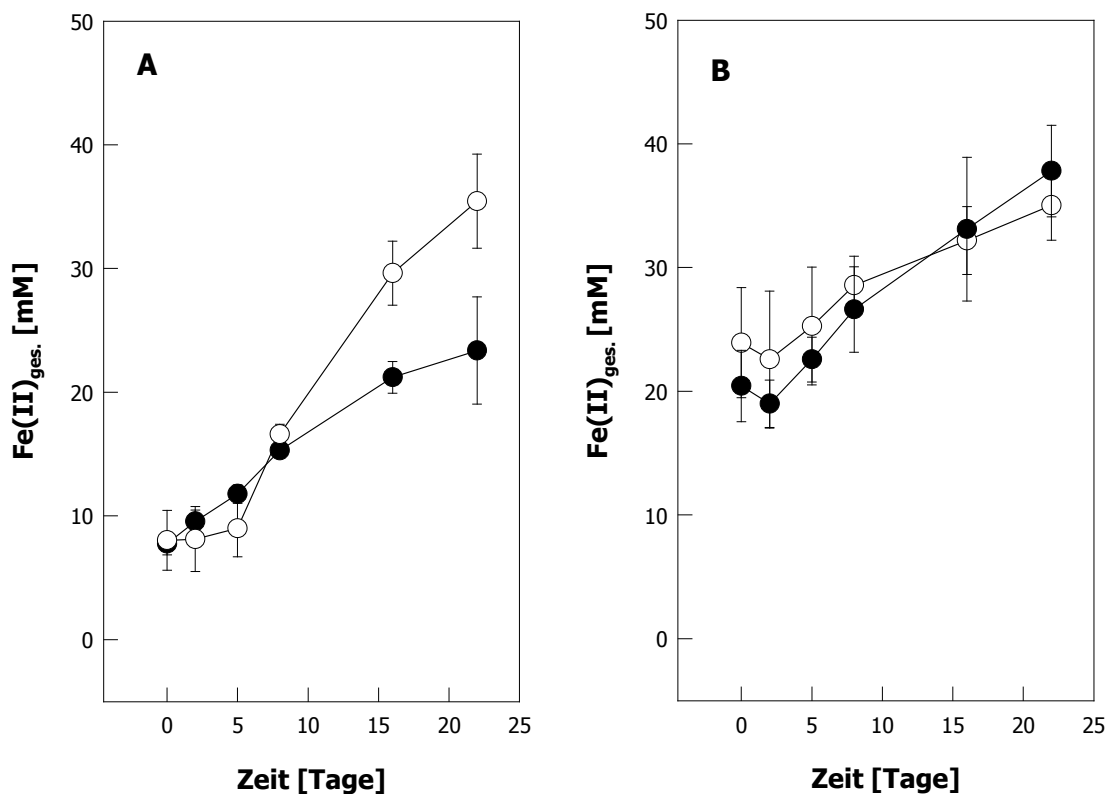


Abbildung 3.2 Effekt des pH-Wertes auf die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (**A**) und Zone III (**B**) des Sediments von Restsee 77. Die ausgefüllten Symbole stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in der jeweiligen Zone beim Original-pH dar. Die offenen Symbole stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung unter geänderten pH-Bedingungen dar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen mit der Standardabweichung.

3.4 Tiefenprofil von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$, Sulfat, pH und der Abundanz von Mikroorganismen im Sediment

An einem einzelnen Sedimentkern (Probenahme vom 28.11.2001) konnte über die Tiefe und Änderung des pH eine Abnahme in der Zellzahl beobachtet werden. Der pH-Wert blieb in den obersten 7,5 cm des untersuchten Sedimentkerns konstant bei pH 3. Im Tiefenbereich von 7,5-10,5 cm kam es zu einem Anstieg im pH-Wert auf 5,5. Mit weiterer Zunahme der Tiefe auf 16,5 cm stieg der pH weiter leicht auf einen Wert von 6 an. Anhand dieses pH-Profiles wurde der Sedimentkern in die Zonen I, II und III eingeteilt (Abbildung 3.3).

Parallel zum pH wurden die Parameter $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$, Sulfat und Zellzahl/ml gemessen. Sulfat wurde über die gesamte Tiefe mit Werten zwischen 7,8 und 17,6 mM bestimmt. In Zone I konnte in der Sulfatkonzentration eine leichte Zunahme von 7,8 auf 11,7 mM beobachtet werden. Die höchste Sulfatkonzentration konnte in Zone III bei einer Tiefe von 12-13,5 cm mit 17,6 mM gemessen werden. Danach nahm die Sulfatkonzentration wieder leicht ab. Für $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ lagen die Konzentrationen in der Zone I zwischen 13,8 und 18,9 mM.

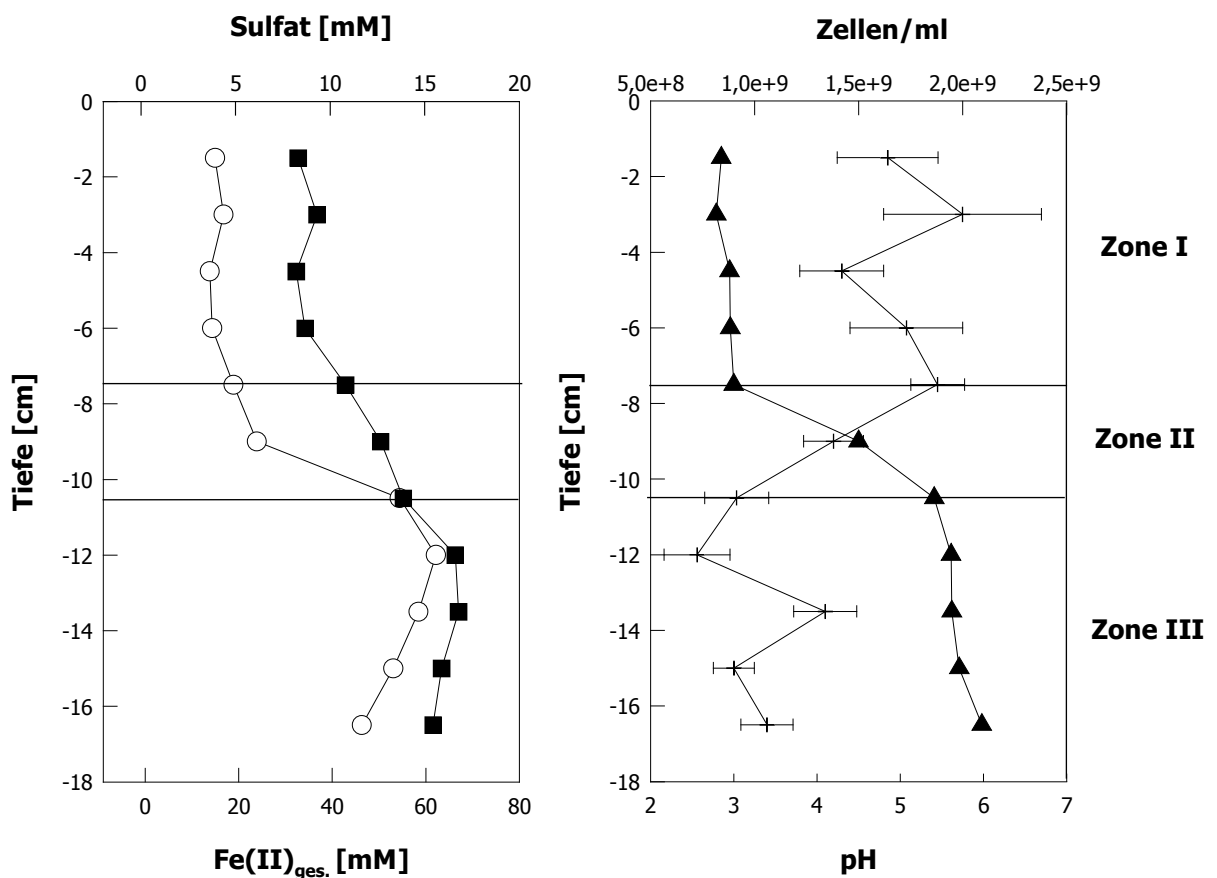


Abbildung 3.3 Verlauf von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ (○), Sulfat (■), pH (▲) und Zellen/ml (+) mit zunehmender Sedimenttiefe im Restsee 77. Bei den dargestellten Werten für $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$, Sulfat und pH handelt es sich jeweils um eine Einzelbestimmung. Bei den Werten für Zellen/ml handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung.

In Zone II stieg die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration auf 54 mM an und erreichte mit 62 mM bei einer Tiefe von -12 cm in Zone III den Maximalwert. Ab dieser Tiefe sank die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration wieder ab auf 46,3 mM bei einer Tiefe von 16,5 cm. Die Zellzahlen für Zone I lagen zwischen $1,64 \times 10^9$ und $2,0 \times 10^9$ Zellen/ml. Mit zunehmender Tiefe sank die Zellzahl und erreichte bei 15 cm in Zone III den geringsten Werte von $9,01 \times 10^8$ Zellen/ml (Abbildung 3.3). Insgesamt lag die Zellkonzentration in Zone I unter pH 3 Bedingungen deutlich über der in Zone III bestimmten Zellkonzentration mit einem pH-Wert zwischen 5,5 und 6.

3.5 Allgemeine Diversität der Bakterien

3.5.1 DGGE-*fingerprint* aus Zone I, II und III

Es konnten für die Zonen I, II und III jeweils 14, 11 und 13 einzelne Banden aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufstrecke im Gel unterschieden werden (Abbildung 3.4). Jeweils fünf Banden ließen sich unterscheiden, die in allen drei untersuchten PCR-Reaktionsprodukten mit der gleichen Laufstrecke im DGGE-Gel auftraten. Die übrigen Banden konnten nur in der jeweiligen Zone nachgewiesen werden. Einzelne Banden wurden zwecks Klonierung und Sequenzierung aus dem Gel ausgeschnitten und die daraus eluierte DNA als Template für einer weitere PCR-Reaktion bzw. für einen Klonierungsschritt verwendet.

Die Amplifizierung der aus den Banden eluierten DNA erbrachte in nur vier von 35 PCR-Reaktionen ein Produkt. Eine erneute Auftragung dieser vier PCR-Produkte auf ein DGGE-Gel zeigte jedoch mehrere Banden. Dies zeigte deutlich, das die erhaltenen DNA-Banden mehr als nur eine Sequenz enthielten. Da die Sequenzierung einzelner Banden über diesen Weg nicht möglich war, wurde die aus den ausgeschnittenen Banden eluierte DNA kloniert. Für diesen Schritt wurden die Banden ausgewählt, die allen drei Zonen gemeinsam waren. Zusätzlich wurden aus Zone I und Zone III drei Banden ausgewählt, die nur in der jeweiligen Zone vorkamen. Mit diesem Klonierungsschritt wurden insgesamt 13, 18 und 24 weiße Klone aus den Zonen I, II und III erhalten. Jedoch enthielten alle erhaltenen Klone ein Insert mit ca. 20 bp. Wahrscheinlich wurden bei diesem Klonierungsschritt Scherungsprodukte der DNA, die sich bei der Eluierung der Banden durch z.B. zu starke mechanische Beanspruchung oder durch Strangbrüche durch UV-Schäden ergeben haben, bevorzugt in den Vektor eingebaut. Daher wurden in einem neuen Klonierungsschritt die mit der Roh-DNA erhaltenen PCR-Produkten kloniert.

3.5.2 DGGE-Klonbibliothek aus Zone I und Zone III

Aus den Klonierungsansätzen wurden 21 Klone für Zone I und 37 Klone für Zone III erhalten. Die RFLP-Analyse dieser Klone ergab insgesamt sechs unterschiedliche RFLP-Muster für Zone I und 13 für Zone III. Alle sechs RFLP-Muster aus Zone I wurden ebenfalls in Zone III gefunden. Die Ergebnisse des Sequenzvergleich der 13 Sequenzen mit der EMBL-Datenbank mittels BLAST-Search sind in Tabelle 3.3 dargestellt. In beiden Klon-Datenbanken zeigte der dominierende Klon mit dem RFLP-Muster A eine 99% Sequenzähnlichkeit zum Isolat WJ2 aus sauren Minenabwässern, einem γ -Proteobakterium (HALLBERG UND JOHNSON 2003). Dieser Klon erschien mit einer Häufigkeit von 30 und 52% in den Klonbibliotheken aus Zone I und Zone III. Ein weiterer in beiden Klonbibliotheken dominierender Klon (10% aus Zone I und 14% aus Zone III) mit dem RFLP-Muster C war mit 99% sequenzähnlich zur Klonsequenz RCP1-57 (BROFFT ET AL. 2002) aus der *Acidimicrobium*-Gruppe.

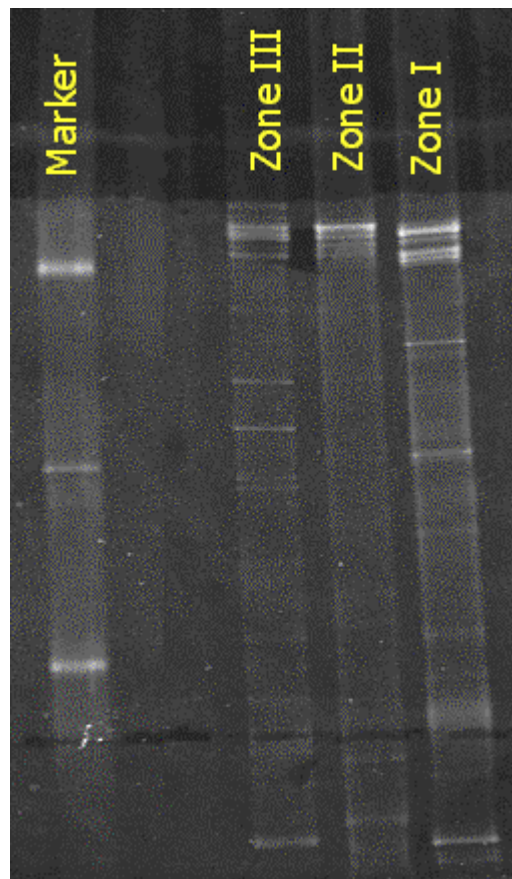


Abbildung 3.4 DGGE-fingerprint aus Zone I (0-7,5 cm), Zone II (7,5-10,5 cm) und Zone III (10,5-16 cm). Beim Marker handelt es sich um einen Mix aus 16S rDNA-Amplifikaten mit dem Primer-Set GM5-Clamp/907RM von den Reinkulturen *E. coli*, *A. capsulatum* und *A. ferrooxidans*.

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der DGGE-Klonbibliotheken aus Zone I und Zone III des Sedimentes von Restsee 77.

RFLP-Muster	Anzahl der Klone				nächster Verwandter	Ähnlichkeit (%)
	Zone I	Häufigkeit in der Klonbibliothek (%)	Zone III	Häufigkeit in der Klonbibliothek (%)		
A	11	52	11	30	<i>γ-Proteobacterium</i> WJ2	99
B	5	24	1	3	Klon RCP2-2 / <i>Actinomycet</i>	100
C	2	10	5	14	Klon RCP1-57 / <i>γ-Proteobakterium</i>	99
D	1	5	2	5	Klon Tui3-12 / <i>Nitrospira</i>	95
E	1	5	5	14	Klon Tui2-22 / <i>Nitrospira</i>	100
F	1	5	2	5	Klon RCP2-3 / <i>Acidobacterium</i>	96
G			3	8	Klon RCP1-25 / <i>Acidiphilium</i>	99
H			2	5	<i>Actinomyces</i> sp. Isolat TM210	92
I			2	5	Klon RCP1-25 / <i>Acidiphilium</i>	99
J			1	3	<i>Acidisphaera</i> sp. NO-15	99
K			1	3	Klon RCP1-25 / <i>Acidiphilium</i>	99
L			1	3	Klon Ep T1.153 / <i>Actinomycet</i>	96
M			1	3	Klon RCP1-56 / <i>Actinomycet</i>	99

Das in beiden Klonbibliotheken auftretende RFLP-Muster B war mit 24% in der Klonbibliothek aus Zone I, in der Klonbibliothek aus Zone III hingegen nur mit 3% vertreten. Dieser Klon war mit 100% zur Klonsequenz RCP2-2 (BROFFT ET AL. 2002), einem Vertreter aus der Gruppe der *Actinomyces*, ähnlich. Weiter konnten Klone (RFLP-Muster G, I, J und K) mit Sequenzähnlichkeit zu *Acidiphilium*-Spezies (BROFFT ET AL. 2002) und *Acidisphaera*-Spezies (JOHNSON ET AL. 2001) nur in Zone III gefunden. Die Klone mit den RFLP-Muster D und E waren zu *Nitrospira*-Klonsequenzen ähnlich (veröffentlicht in EMBL 2001 von HOWARTH ET AL.). Ein Klon (RFLP-Muster F) wies die höchste Sequenzähnlichkeit zum *Acidobacteria*-Klon RCP2-3 auf (BROFFT ET AL. 2002).

3.5.3 Allgemeine Klonbibliothek aus Zone I und Zone III

Ein Vergleich der erhaltenen Klonsequenzen aus den Klonbibliotheken der Zone I und Zone III in Bezug auf ihre phylogenetische Gruppenzugehörigkeit zeigte, dass in der Klonbibliothek aus Zone III eine größere Diversität gefunden wurde, als in der Klonbibliothek aus Zone I (Abbildung 3.5, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Für die Erfassung der allgemeinen Diversität wurden aus den erstellten Klonbibliotheken 185 Klone aus Zone I und 95 Klone aus der Zone III mittels DGGE auf redundante Klone durchsucht. In Abhängigkeit von der Laufweite im Gel konnten für die Zone I 40 und für die Zone III 42 unterschiedliche Banden identifiziert werden. In der Klonbibliothek aus Zone I konnten Klonsequenzen aus 10 unterschiedlichen Gruppen gefunden werden. Die am stärksten vertretene Gruppe der Acidobacteria machte 46% der gesamten Klonsequenzen aus. Des Weiteren konnten die Gruppen Nitrospira (11%), Cytophagales (11%), α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien (3%, 14%, 11% und 3%) sowie Firmicutes (3%) gefunden werden. In der Klonbibliothek aus Zone III konnten insgesamt 12 unterschiedliche Gruppen nachgewiesen werden. Die Gruppe der Acidobacteria war mit 45% wie schon in der Klonbibliothek aus Zone I die am stärksten vertretene Gruppe. Gefunden wurden wie in Zone I die Gruppen Nitrospira (8%), Cytophagales (9%) sowie die α -, γ - und δ -Proteobakterien (5%, 8% und 8%). Die Gruppen der β -Proteobakterien, Firmicutes und der Actinomyceten aus Zone I konnten in Zone III nicht gefunden werden. Gruppen, die nur in der Klonbibliothek aus Zone III gefunden wurden, waren *Verruimicrobia*/Subdivision 5 (3%), *Thermus*/*Deinococcus*-Gruppe (3%), OP3-Gruppe (3%), *Bacillus*-*Clostridium*-Gruppe (8%) sowie eine als „nicht kultiviert“ bezeichnete Gruppe (3%), die derzeit nur als Klonsequenzen vorliegen.

Bis auf eine einzige Klonsequenz fielen alle erhaltenen Acidobacteria-Klonsequenzen in Gruppe I der Acidobacteria (Abbildung 3.6). Eine Gruppierung von Sequenzen aus Zone I oder Zone III konnte nicht beobachtet werden. Die Gruppe der Acidobacteria werden in acht

unterschiedliche Gruppen unterteilt (Gruppe I-VIII; BARNES ET AL. 1999). In die Gruppe I fallen die kultivierten Vertreter *Acidobacterium capsulatum* (KISHIMOTO ET AL. 1991, KUSKE ET AL. 1998) sowie das Isolat Ellin310 (SAIT ET AL. 2002). Zwei weitere kultivierte Vertreter mit *Holophaga foetida* (LIESACK ET AL. 1994) sowie *Geothrix fermentans* (LONERGAN ET AL. 1996) fallen in die Gruppe VIII.

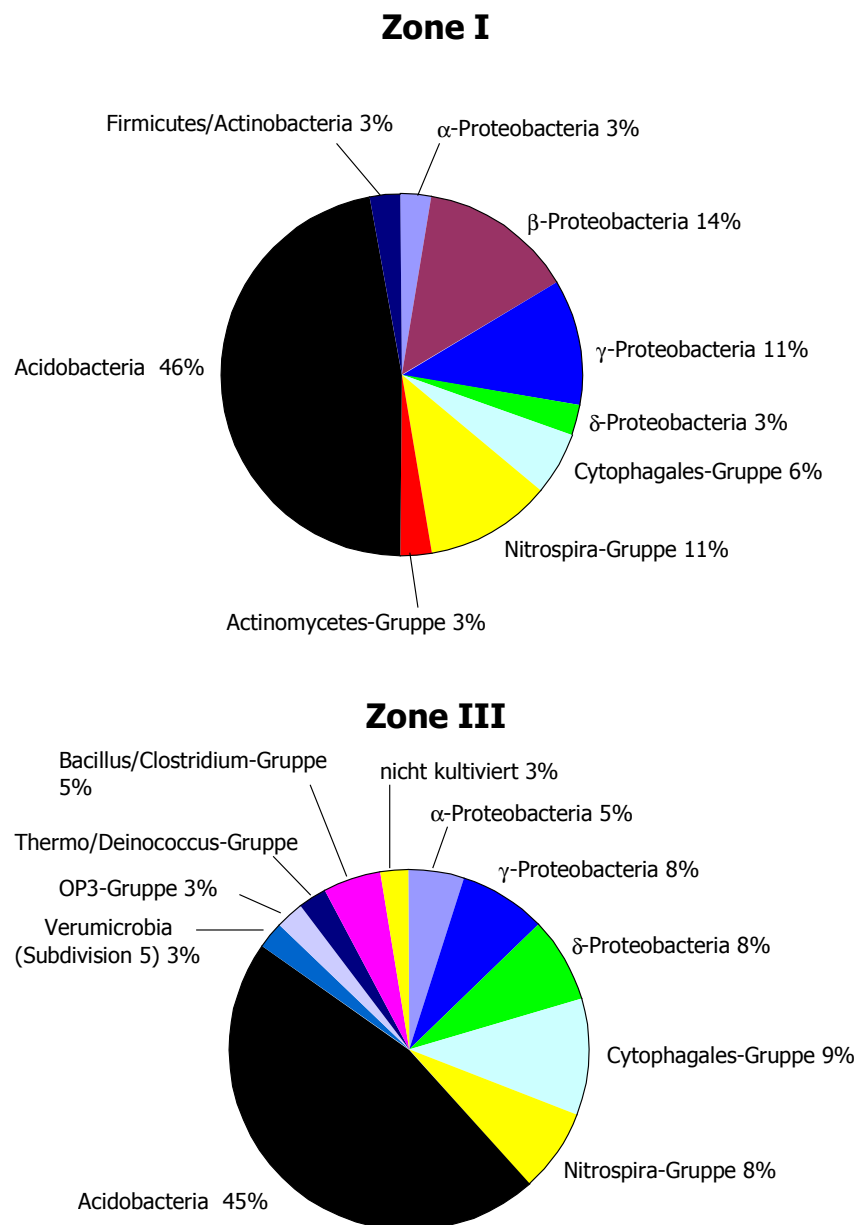


Abbildung 3.5 Zugehörigkeit der erhaltenen Klonsequenzen in Klonbibliotheken aus Zone I und Zone III zu den phylogenetischen Großgruppen.

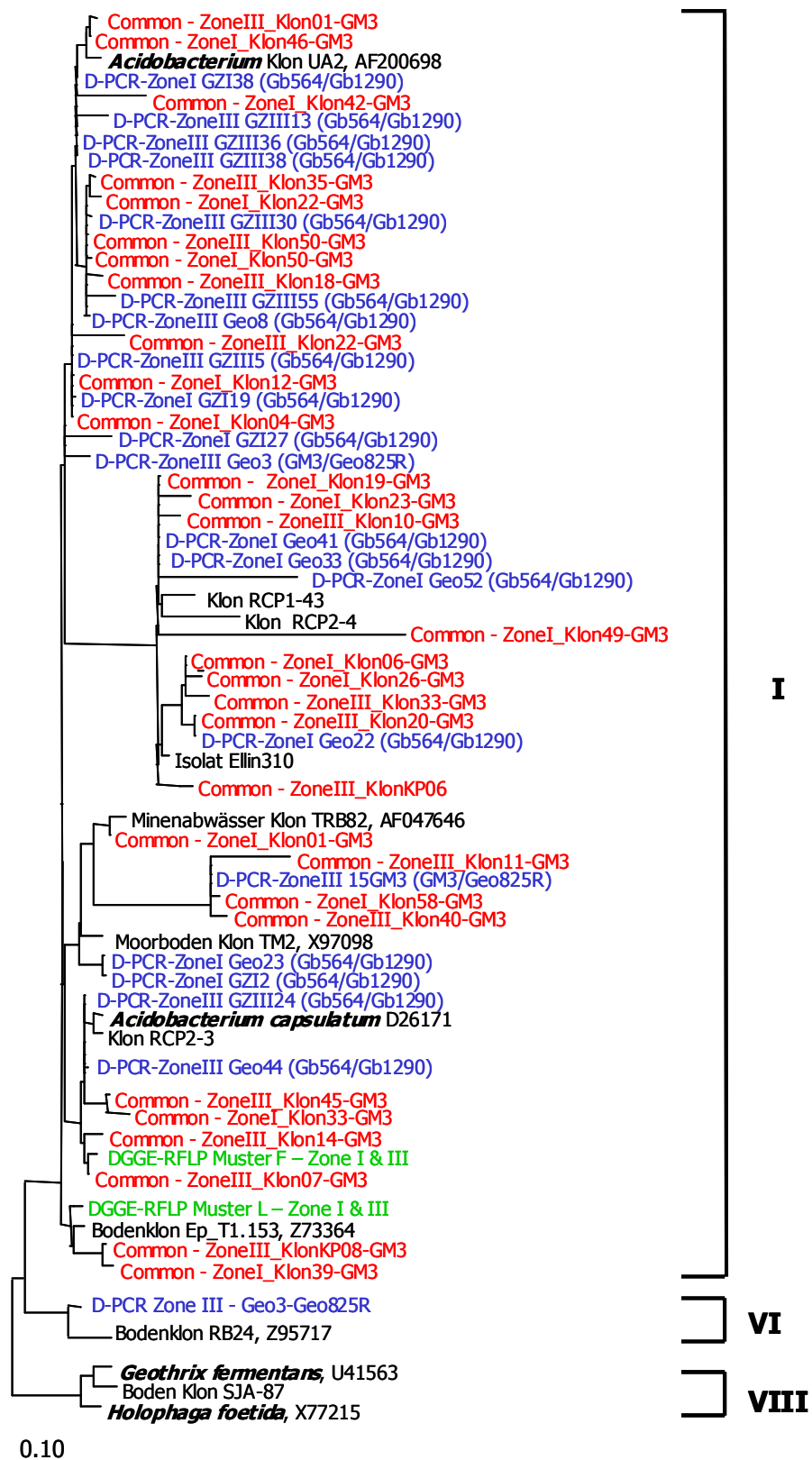


Abbildung 3.6 Phylogenetische Verwandtschaft der Klone aus Zone I und Zone III aus der Gruppe der *Acidobacteria*. (rot) allgemeinen Klonbibliothek; (blau) Klonbibliothek aus der Verdünnungs-PCR; (grün) DGGE-Klonbibliothek.

Die Gruppen II-V sowie Gruppe VII wurden im Baum nicht dargestellt, da keine der mit den unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden erhaltenen Sequenzen in diese Gruppe fielen. Insgesamt wurden aus der allgemeinen Klonbibliothek 16 Klonsequenzen aus Zone I und 14 Klonsequenzen aus Zone III (rot markiert), aus der DGGE-Klonbibliothek 2 Sequenzen aus Zone I und Zone III (grün markiert) sowie 21 Klonsequenzen aus der Verdünnungs-PCR (siehe 3.10; blau markiert) mit 10 Klonsequenzen aus Zone I und 11 Klonsequenzen aus Zone III in den Baum eingerechnet.

Es konnte mit den Primer-Set für die Archaea kein PCR-Produkt erhalten werden.

3.5.4 Rarefaction-Analyse der erstellten DGGE- und allgemeinen Klonbibliotheken

Sowohl die Klonbibliotheken, die mit den DGGE PCR-Produkten erstellt wurden, als auch die allgemeinen Klonbibliotheken, die aus den PCR-Produkten mit den allgemeinen Bakterienprimern GM3/GM4 erstellt wurden, zeigten in den aus der Zone III erstellten Klonbibliotheken eine signifikant (Signifikanzniveau >95%) größere Diversität als in den aus Zone I erstellten Klonbibliotheken (Abbildung 3.7). Der Deckungsgrad der Klonbibliotheken mit dem universellen Bakterien Primer-Set GM3/GM4 lag für Zone I bei 85% und für Zone III bei 65%. Der deutlich geringere Deckungsgrad in der Klonbibliothek aus Zone III lässt schließen, dass durch weiteres Klon-Screening weitere OTU's, und damit möglicherweise noch andere Gruppen, gefunden worden wären. Theoretisch wären hier bis zu 65 unterschiedliche OTU's zu erwarten. Hierdurch hätte sich die Anzahl der Gruppen in Zone III und damit auch der Unterschied zu der Klonbibliothek aus Zone I weiter erhöht. Für die allgemeine Klonbibliothek aus Zone I hätte nur ein erheblicher Mehraufwand zur Auffindung weiterer OTU's geführt.

Bei den Klonbibliotheken mit dem universellen Bakterien Primer-Set GM5-clamp/907RM lag der Deckungsgrad der Klonbibliotheken sowohl für Zone I als auch für Zone III bei 85%. Um aus diesen Klonbibliotheken weitere RFLP-Muster zu erhalten, hätte hier im Vergleich zu der allgemeinen Klonbibliothek ein viel größerer Aufwand betrieben werden müssen.

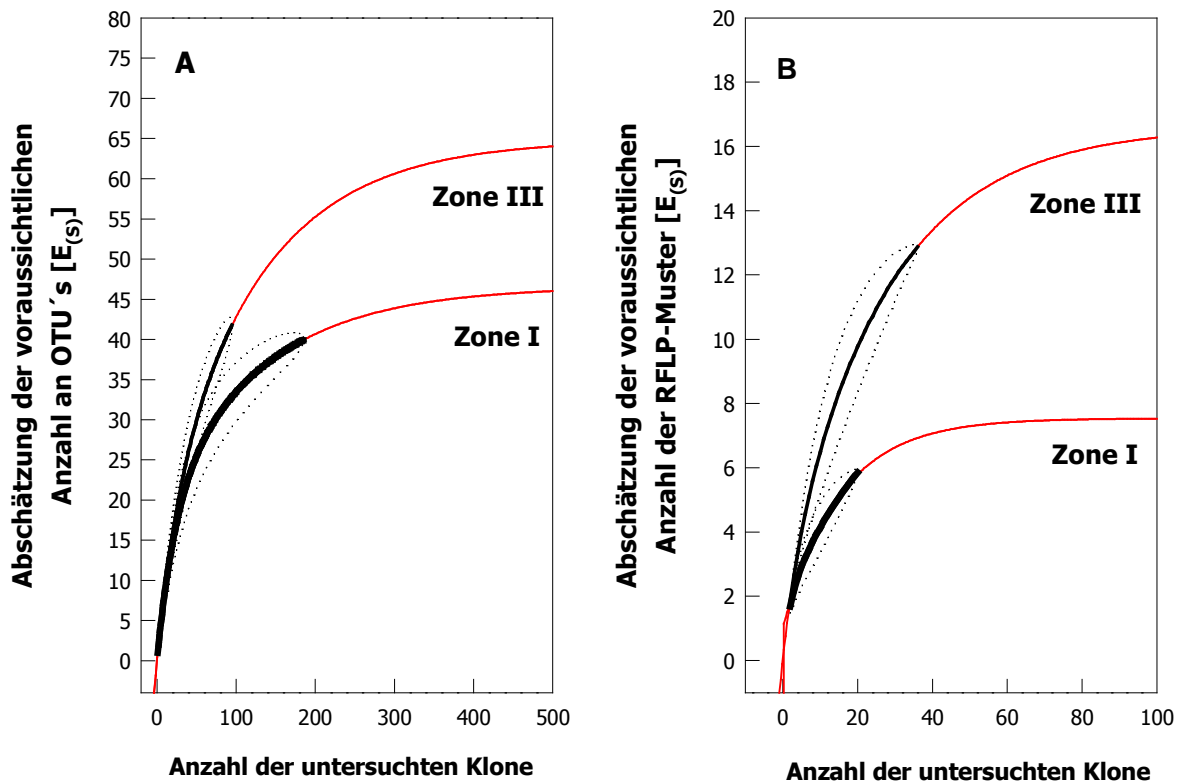


Abbildung 3.7 Rarefaction-Analyse der allgemeinen Klonbibliotheken (**A**) und der DGGE-Klonbibliotheken (**B**) aus den Sedimentzonen I und III. Die Abschätzung der voraussichtlichen Anzahl an OTU's oder RFLP-Mustern $[E_{(s)}]$ wurde aus der Anzahl der analysierten Klone durch RFLP-Muster oder DGGE-Gel berechnet. Die rot dargestellten Kurven geben den theoretischen Verlauf für $E_{(s)}$ wider, wenn weitere Klone untersucht worden wären.

3.6 Analyse der SRB-Diversität mittels PhyloChip in den Zonen I, II und III

Die allgemeinen Bakteriensonden EUB338, UNIV1389a, UNIV1389b und UNIV1389c sowie die allgemeine Sonde für die δ -Proteobakterien DELTA495a ergaben in allen Zonen ein positives Signal. In den untersuchten Sedimentzonen I, II und III von Restsee 77 konnte ein positives Signal mit der Sonde DSBAC355 für Vertreter der Ordnungen "*Syntrophobacterales*" und "*Desulfobacterales*" erhalten werden. Die Anzahl der positiven Signale mit Sonden höherer Spezifität für Vertreter dieser zwei Gruppen nehmen mit der Tiefe des Sediments zu (Abbildung 3.8 und Tabelle 3.4). Die Sonden SYBAC697 und SYBAC986 für Vertreter der *Syntrophobacter*, *Desulfovira* und *Desulforhabdus* gaben nur in den Zonen II und III ein positives Signal. Während die Sonde SYBAC697 in allen drei Parallelansätzen in Zone II und Zone III als positiv bewertet wurde, zeigten die Signalintensitäten der Sonde SYBAC986 in Zone II nur in zwei von drei Proben ein positives Signal. In Zone III waren auch bei dieser

Sonde alle drei Parallelansätze positiv. Sonde SYBAC587b, welche nur in Zone III ein positives Signal ergab, deutet auch auf das Vorkommen von mit *Syntrophobacter wolinii* verwandten Bakterien hin. Mit der spezifischen Sonde ARCH917 für Archaea konnte in keiner der untersuchten Zonen ein positives Signal erhalten werden. Dieses Ergebnis stimmt damit überein, dass mit allgemeinen Archaea-Primern kein positives PCR-Produkt in den Zonen I, II und III erhalten werden konnte (siehe 3.5.3).

Tabelle 3.4 Signalintensitäten der 16S rRNA-Gensonden für sulfatreduzierende Bakterien und Archaeen. Sonden, deren Signalintensität ≥ 2 betrug und somit als positives Signal gewertet wurden, sind fett vorgehoben.

Gene ID	Zone I	Zone II	Zone III	Spezifisch für
ARCH917	1,01	0,91	1,03	Archaeen
UNIV1389a	13,92	10,33	7,70	Allgemeine Bacteria-Sonden
UNIV1389b	17,75	12,56	9,18	
UNIV1389c	3,35	2,96	2,47	
DELTA495a	2,05	2,80	2,08	Allgemeine SRB-Sonden
DSBAC255	22,29	19,38	18,34	
SRB385	1,80	2,97	3,08	
SRB385Db	7,26	5,05	3,69	
DSS658	1,15	2,54	4,13	Einige Mitglieder der <i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Desulfostipes</i> , <i>Desulfobacterium</i> , <i>Desulfosarcina</i>
DSV698	0,83	2,82	1,30	
SYBAC697	3,99	3,01	6,31	<i>Syntrophobacter</i> / <i>Desulfovirga</i> / <i>Desulfo-</i> <i>rhabdus</i> -Gruppe innerhalb der <i>Syntrophobacteraceae</i>
SYBAC986	1,12	2,67	2,52	
SYN835	0,95	1,17	2,95	
SYBAC587b	0,86	0,84	2,86	
NTSPA714	2,67	1,04	1,72	Phylum <i>Nitrospira</i>
LGC354b	6,12	1,02	1,53	Phylum <i>Firmicutes</i>

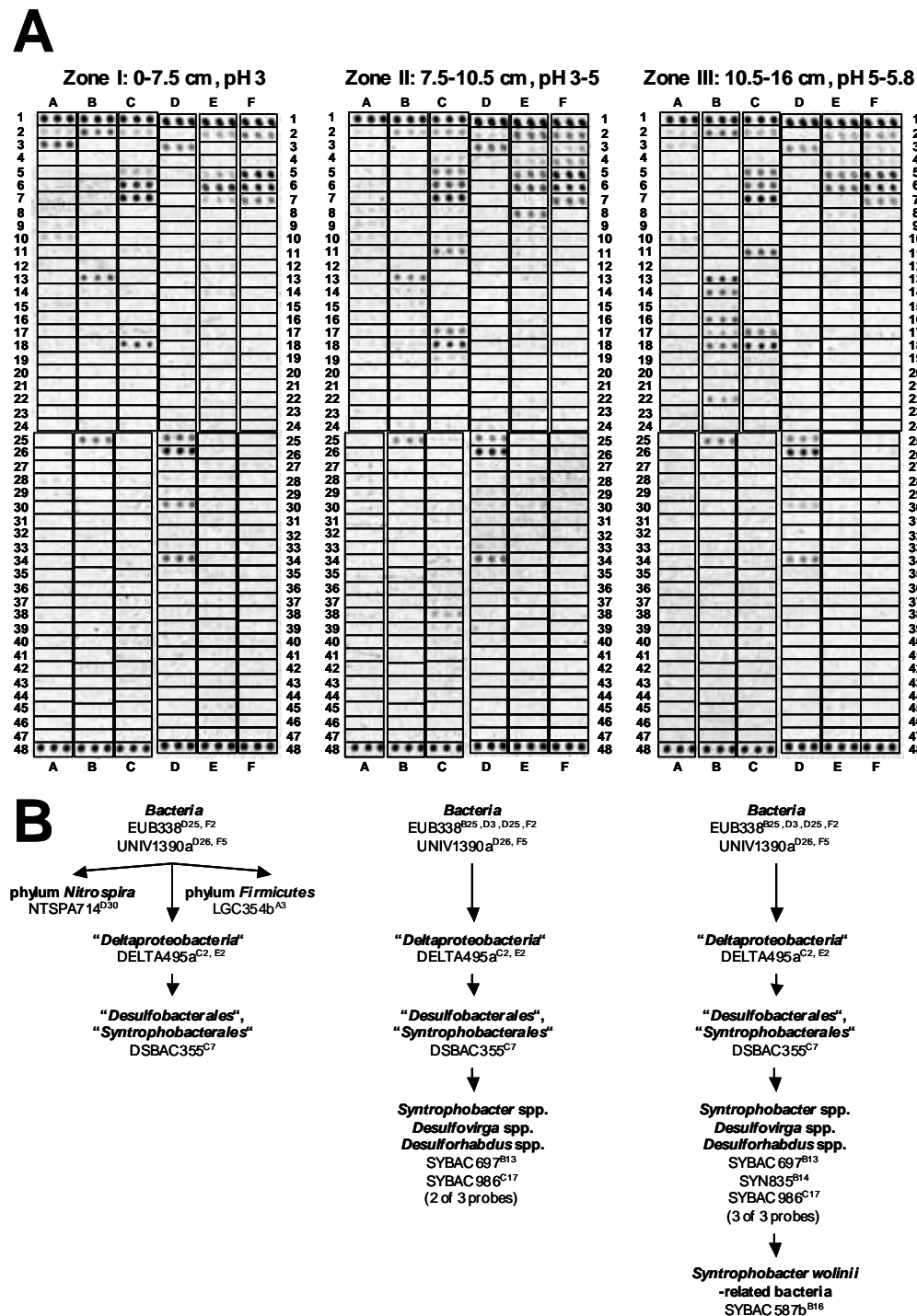


Abbildung 3.8 Ergebnisse der PhyloChip-Untersuchung zur Diversität der SRB's. **(A)** Verwendeter SRB-PhyloChip zur Erfassung der Diversität der sulfatreduzierenden Bakterien in den Zone I, II und III im Sediment von Restsee 77. Auf dem Microarray wurden die Sonden in drei Parallelen aufgebracht. Sonden mit einem Signal-Rausch-Verhältniss ≥ 2 wurden als positiv gewertet und sind in der Abbildung durch drei Punkte dargestellt. Die unter **(B)** dargestellten Sonden stellen die als positiv bewerteten Sonden und ihre Gruppenspezifität dar.

Die mit den PhyloChip erhaltenen Ergebnisse werden zur Bestätigung normalerweise mit anderer molekularbiologischer Methoden verifiziert (LOY ET AL. 2002). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PhyloChip-Analyse konnten in der allgemeinen Klonbibliothek (siehe 3.5.3) jeweils ein Klon mit einer Sequenzähnlichkeit zu *Desulfobacterium indolicum*, ein Klon mit einer Sequenzähnlichkeit zu *Desulfobacca acetoxidans*, sowie zwei Klone mit Sequenzähnlichkeiten zur Familie der Geobacteraceae gefunden werden. Weitere Übereinstimmungen bestanden im Auffinden von Klonsequenzen aus dem Phylum Firmicutes. Diese wurden sowohl in der allgemeinen Klondatenbank als auch mit der PhyloChip-Analyse ausschließlich in Zone I nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine Extrabestätigung der PhyloChip-Ergebnisse verzichtet.

Lediglich bei dem Phylum Nitrospira gab es im Vergleich unterschiedliche Ergebnisse. So wurde dieses Phylum in der allgemeinen Klonbibliothek sowohl in Zone I als auch in Zone III nachgewiesen, während mit dem PhyloChip dieses Phylum nur in Zone I nachgewiesen werden konnte.

Hypothese II: Azidophile Bakterien sind an der Reduktion von Fe(III) auch unter schwach sauren Bedingungen beteiligt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Fe(III)-Reduktion unterschiedlicher Fe(III)-Quellen (mineralische auch lösliche Fe(III)-Quellen) bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Hierfür wurden zwei Reinkulturen als Modellorganismus verwendet. Als autotropher Organismus wurde *A. ferrooxidans* gewählt, da dieser sehr häufig in sauren Minenabwässern gefunden wird. Seine Fähigkeit zur Reduktion von Fe(III) ist weitgehend beschrieben, jedoch liegen bisher keine Informationen über den Einfluss des pHs auf diesen Metabolismus vor. Als heterotropher Modellorganismus wurde *A. capsulatum* gewählt. Die Wahl fiel auf diesen Organismus, da zum einen die in dieser Arbeit erstellten Klonbibliotheken einen großen Anteil an Acidobacteria-Klonsequenzen aufwiesen. Zum anderen wurden Klonsequenzen aus dieser Gruppen in anderen molekularbiologischen Untersuchungen, unter anderem auch in sauren Minenabwässern, gefunden (HUGENHOLTZ ET AL. 1998). Allerdings liegen bis heute keine Untersuchungen zu Fe(III)-Reduktion durch diesen Organismus vor. Alle Versuche mit den zwei Reinkulturen wurden aus oxischen Vorkulturen angeimpft. Die Vorkultur für die Versuche mit *A. ferrooxidans* wurde in Medium 70 (pH 1,4), die für die Versuche mit *A. capsulatum* wurde in Acido-Medium (pH 3) angezogenen (siehe 2.4.6).

Weiterhin wurde die Verteilung azidophiler Fe(III)-Reduzierer im Sediment mittels molekularbiologischer Methoden untersucht. Hierfür wurde die aus den Zonen I, II und III extrahierte DNA unter Verwendung gruppenspezifischer Primer mittels einer Verdünnungs-PCR amplifiziert. Die Verdünnungsstufen, in denen noch ein PCR-Signal erhalten werden konnte, wurde als ein Hinweis über die Verteilung der einzelnen Gruppen in den drei Sedimentzonen gewertet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über RFLP-Screening analysiert.

3.7 Einfluss des pH auf die Reduktion von $\text{Fe(III)}_2(\text{SO}_4)_3$ durch *A. ferrooxidans* unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM S° als Elektronendonator

A. ferrooxidans konnte unter anaeroben Bedingungen im pH-Bereich von 1,8-3,1 $\text{Fe(III)}_2(\text{SO}_4)_3$ mit elementarem Schwefel (10 mM) als Elektronendonator reduzieren. Ein Vergleich der ermittelten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten ergab höhere Raten unter saureren pH-Werten. Bei pH 1,8 und 2,0 wurde innerhalb von 10 Tagen das gesamte Fe(III) zu Fe(II) reduziert (Abbildung 3.9). Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung bei pH 1,8 erfolgte mit einer Rate von $6,7 \text{ mmol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Diese Rate lag bei einem pH von 2 bei $5,2 \text{ mmol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Mit einer weiteren

Erhöhung des pH auf 2,7 und 3,1 sank die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates weiter ab. Bei diesen pH-Werten lag die Rate bei 4,7 bzw. 3,5 $\text{mmol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass bei den pH-Werten über 2 nur noch ca. 80% des zugesetzten Fe(III) über die Versuchszeitspanne von 55 Tagen zu Fe(II) reduziert wurden. In den Ansätzen mit pH 1,8 und 2,0 zu Versuchsbeginn lag bei Versuchsende der pH-Wert um ca. 0,7 pH-Einheiten höher. Bei den Ansätzen mit pH 2,7 und 3,1 konnte eine etwas geringere pH-Zunahme von ca. 0,4 pH-Einheiten ermittelt werden.

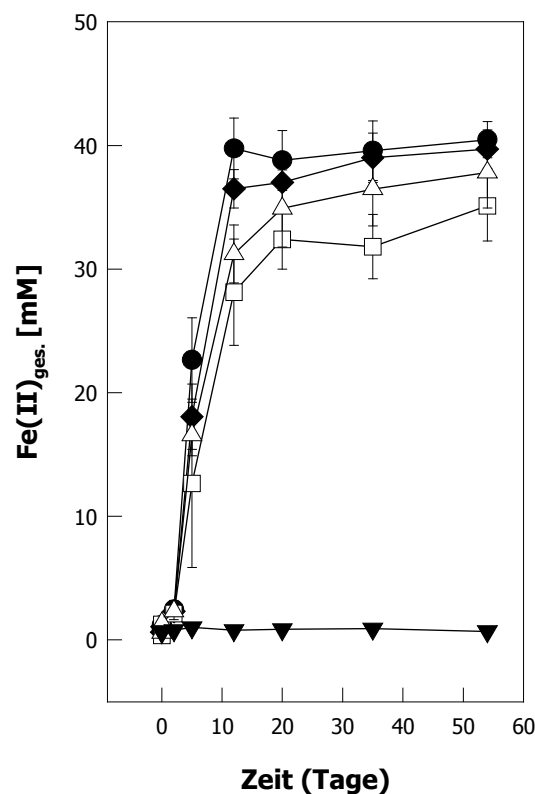


Abbildung 3.9 Einfluss des pH auf die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus löslichem $\text{Fe(III)}_2(\text{SO}_4)_3$ durch *A. ferrooxidans* mit elementarem Schwefel (10 mM) als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen bei 30°C und den pH-Werten 1,8 (●), 2,0 (◆), 2,7 (△) und 3,1 (□). Als Kontrolle (▼) diente ein nicht inokulierter Ansatz.

3.8 Einfluss des pH auf die Reduktion von unterschiedlichen Fe(III) -Oxide durch *A. ferrooxidans* unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM S^0 als Elektronendonator

A. ferrooxidans konnte bei pH 3 die zugesetzten Fe(III) -Oxide Schwertmannit_{autokl.}, Goethit und das amorphe Fe(OH)_3 reduzieren (Abbildung 3.10). Die ermittelten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates waren mit 76 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und 47 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ beim amorphem Fe(OH)_3 sowie beim Schwertmannit_{autokl.} zwei schwachkristallinen Fe(III) -Oxiden, am höchsten. Die

geringste $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates zeigte bei pH 3 der stärker kristalline Goethit mit $18 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

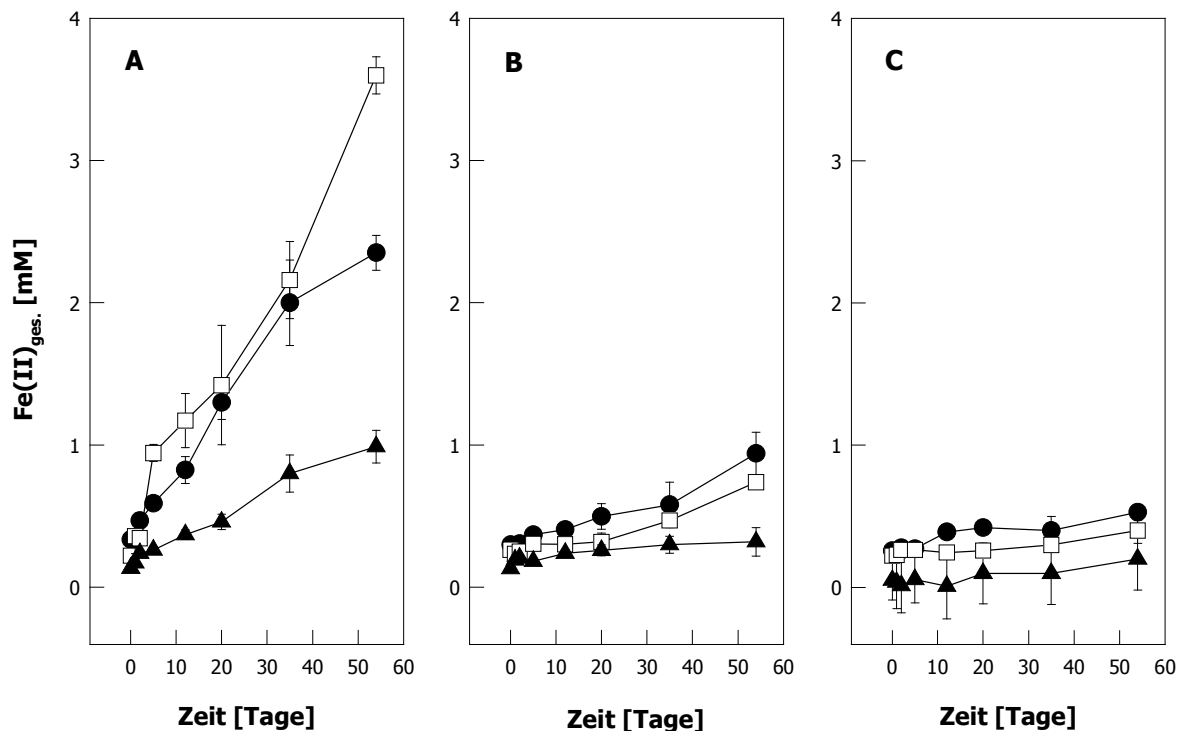


Abbildung 3.10 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit_{autokl.} (●), Fe(OH)_3 (□) und Goethit (▲) durch *A. ferrooxidans* mit elementarem Schwefel als Elektronendonator bei 30°C und pH 3 (A), pH 4 (B) und pH 5 (C). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Parallelansätzen.

Mit einer Erhöhung auf pH 4 konnte nur noch bei den schwachkristallinen Fe(III) -Oxiden Schwertmannit_{autokl.} und amorphes Fe(OH)_3 eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung gemessen werden. Mit Goethit konnte bei diesem pH über die Versuchszeitspanne von 55 Tagen keine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung beobachtet werden. Bei einer weiteren Anhebung auf pH 5 konnte nur noch mit Schwertmannit eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über die Versuchszeitspanne beobachtet werden. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates lag hier bei $4 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. In den pH 3-Ansätzen konnte eine Zunahme im pH-Wert gemessen werden, wobei die größte Änderung von ca. 0,4 pH-Einheiten beim Schwertmannit und beim Fe(OH)_3 gemessen wurden. Beim Goethit betrug die Zunahme ca. 0,3 pH-Einheiten. Bei den pH 4-Ansätzen konnte lediglich beim Schwertmannit eine leichte Zunahme im pH-Wert von ca. 0,3 pH-Einheiten ermittelt werden, während bei pH 5 keine Zunahme bei keinem der drei Fe(III) -Minerale gemessen werden konnte. In den nicht inokulierten Kontrollansätzen konnte über die gesamte Messzeitspanne keine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration beobachtet werden. Eine rein chemische Reduktion der verwendeten Fe(III) -Minerale konnte daher ausgeschlossen werden.

Um eine mögliche Beeinflussung der Kristallinität von Schwertmannit durch das Autoklavieren zu untersuchen, wurde der Versuch mit Schwertmannit_{sterilf.} wiederholt (Abbildung 3.11). Bei der Verwendung von Schwertmannit_{sterilf.} konnte bei pH 3 eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates von $84 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ermittelt werden. Sie lag im Vergleich mit der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates aus Schwertmannit_{autokl.} um den Faktor 2 höher. Bei pH 4 konnte mit $21,3 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ eine im Vergleich bei pH 4 mit Schwertmannit_{autokl.} etwas höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates erzielt werden. Bei pH 5 konnte hingegen keine Zunahme im $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ über die Zeit beobachtet werden. Dies Ergebnis zeigte, dass durch das Autoklavieren der Schwertmannit einer Veränderung unterlag, die auf die mikrobielle Reduzierbarkeit unter sauren Bedingungen einen negativen Einfluss hat. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in allen nachfolgenden Versuchen nur noch mit Schwertmannit_{sterilf.} gearbeitet.

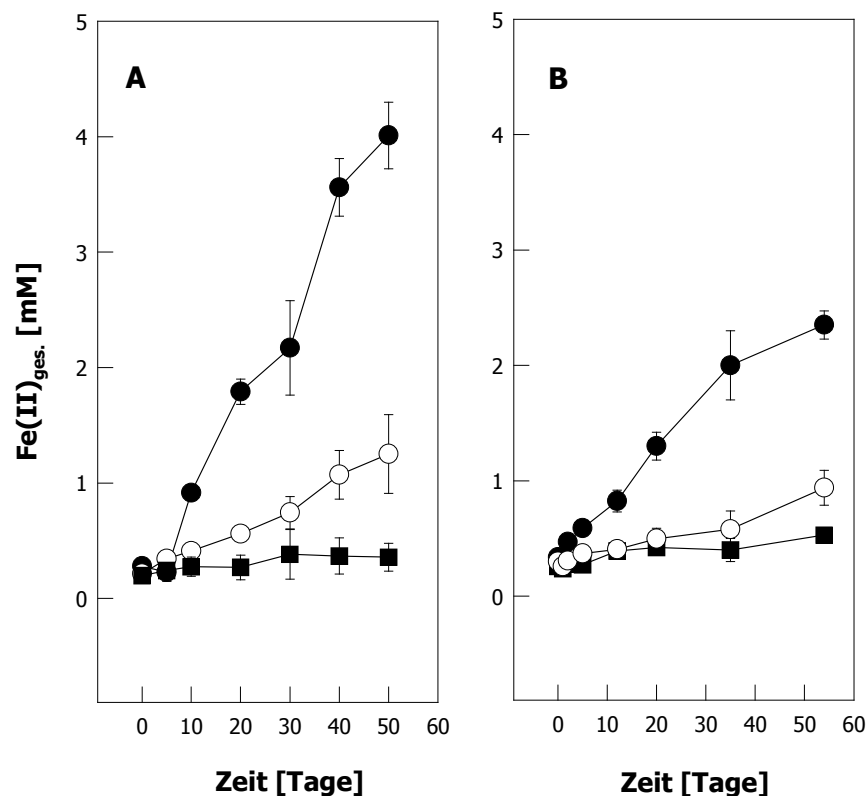


Abbildung 3.11 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit_{sterilf.} (A) und Schwertmannit_{autokl.} (B) bei pH 3 (●), 4 (○) und 5 (■) durch *A. ferrooxidans* mit elementarem Schwefel (10 mM) unter anaeroben Bedingungen bei 30°C. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Parallelansätzen.

3.9 Reduktion von löslichen Fe(III)-Verbindungen und Fe(III)-Oxiden durch *A. capsulatum* unter anoxischen Bedingungen

In Kulturen von *A. capsulatum* konnte in einem pH-Bereich von 2,2 bis 5 eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus unterschiedlichen Fe(III)-Quellen mit Glukose (2 mM) als Elektronendonator beobachtet werden.

Mit dem getesteten Fe(III)-Oxid Fe(OH)_3 konnte zwischen pH 3 und pH 5 kein Unterschied festgestellt werden. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über die Zeit erfolgte bei beiden pH-Werten nahezu parallel. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates bei pH 3 betrug $54 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Bei pH 5 betrug die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates $60 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Mit Goethit zeigte sich im Versuchsverlauf bei pH 3 im Vergleich zu pH 5 eine gesteigerte $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung. Bei pH 3 konnte nach 14 Tagen eine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration mit einer Rate von $48 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ gemessen werden. Bei pH 5 konnte erst nach 21 Tagen eine gesteigerte $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung beobachtet werden. Bei diesem pH-Wert lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates in den ersten 21 Tagen bei ca. $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und stieg in den letzten 15 Tagen auf ca. $84 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ an. Zum Zeitpunkt t_{Ende} lagen bei beiden pH-Werten die gemessenen $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen relativ nah bei ca. 1,4 mM. Allerdings wiesen die Messwerte (Goethit, pH 5) zu Versuchsende eine relativ hohe Standardabweichung auf, was einen eventuell vorhandenen Unterschied überdeckt. In den Kontrollansätzen (*A. capsulatum* mit Fe(III)-Quelle aber ohne Glukose) konnte über eine Zeitspanne von 35 Tagen bei den mineralischen Fe(III)-Quellen keine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration beobachtet werden (Tabelle 3.6).

Bei der Verwendung der löslichen Fe(III)-Formen FeCitrat und FePP_i konnten im Gegensatz zu den mineralischen Formen teilweise höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration zum Zeitpunkt t_{Ende} als auch höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates ermittelt werden. Insgesamt wurden die höheren $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates bei pH 5 bestimmt. Die größte $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates wurde mit FeCitrat bei pH 5 mit $590 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ermittelt. In diesem Ansatz kam es in den ersten 7 Tagen zu einer geringen Zunahme um 1,5 mM $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$. Mit zunehmender Versuchsdauer wurde dann alles Fe(III) zu Fe(II) reduziert. Mit FePP_i lag bei pH 5 die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates bei $147 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Geringere Freisetzungsrates wurden unter saureren pH-Bedingungen (pH 3) ermittelt. So wurden bei pH 3 und FeCitrat über die ganze Versuchsdauer mit einer $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates von $89 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ nur ca. 15% (= 3,15 mM $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$) reduziert. Mit FePP_i konnte bei pH 3 keine Fe(II)-Bildung bestimmt werden. Hier stieg in den ersten 7 Tagen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration auf 1,59 mM, doch sank dieser Wert bis zum Versuchsende wieder auf 1,2 mM ab. Ein abweichendes Ergebnis wurde bei der Verwendung von 40 mM $\text{Fe(III)}_3(\text{SO}_4)_2$ beobachtet. In diesem Ansatz konnte die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates mit $32,5 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ bestimmt werden. Der pH lag in diesen

Ansätzen bei 2,2 und lag damit unter dem für das Wachstum unter oxidischen Bedingungen benötigte pH-Spektrum von 3-6 (KISHIMOTO ET AL. 1991).

In den Kontrollansätzen (Tabelle 3.6) mit den löslichen Fe(III)-Quellen konnte in allen Ansätzen eine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration zwischen dem 21ten und dem 35ten Versuchstag gemessen werden. Alle Kontrollansätze unterlagen zwischen dem 21ten und dem 35ten Versuchstag versehendlich über mehrere Tage einem Lichteinfluss. Diese Ansätze waren nicht, wie die inokulierten Versuchsansätze, zum Schutz mit einer lichtundurchlässigen Folie umwickelt. Da die Medien organische Säuren wie Acetat und Citrat enthielten, konnte eine photochemischen Reduktion des Fe(III) in den Kontrollansätzen nicht ausgeschlossen werden. Eine eventuelle Fe(III)-Reduktion durch *A. capsulatum* mit dem im Medium vorliegenden Citrat als Energiequelle kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden, da die aus den Kontrollansätzen gezogenen Proben für die Bestimmung von organischen Säuren aufgrund technischer Probleme nicht mehr analysiert werden konnten. Ein Wachstum von *A. capsulatum* konnte in keinem Ansatz nachgewiesen werden. Tabelle 3.5 gibt die Bestimmung der Zellzahl der einzelnen Versuchsansätze zu den Zeitpunkten t_0 und t_{Ende} wieder.

Tabelle 3.5 Bestimmung der Zellzahl/ml mittels DAPI-Färbung in den Versuchsansätzen zu den Zeitpunkten t_0 und t_{35} im Versuch mit *A. capsulatum*.

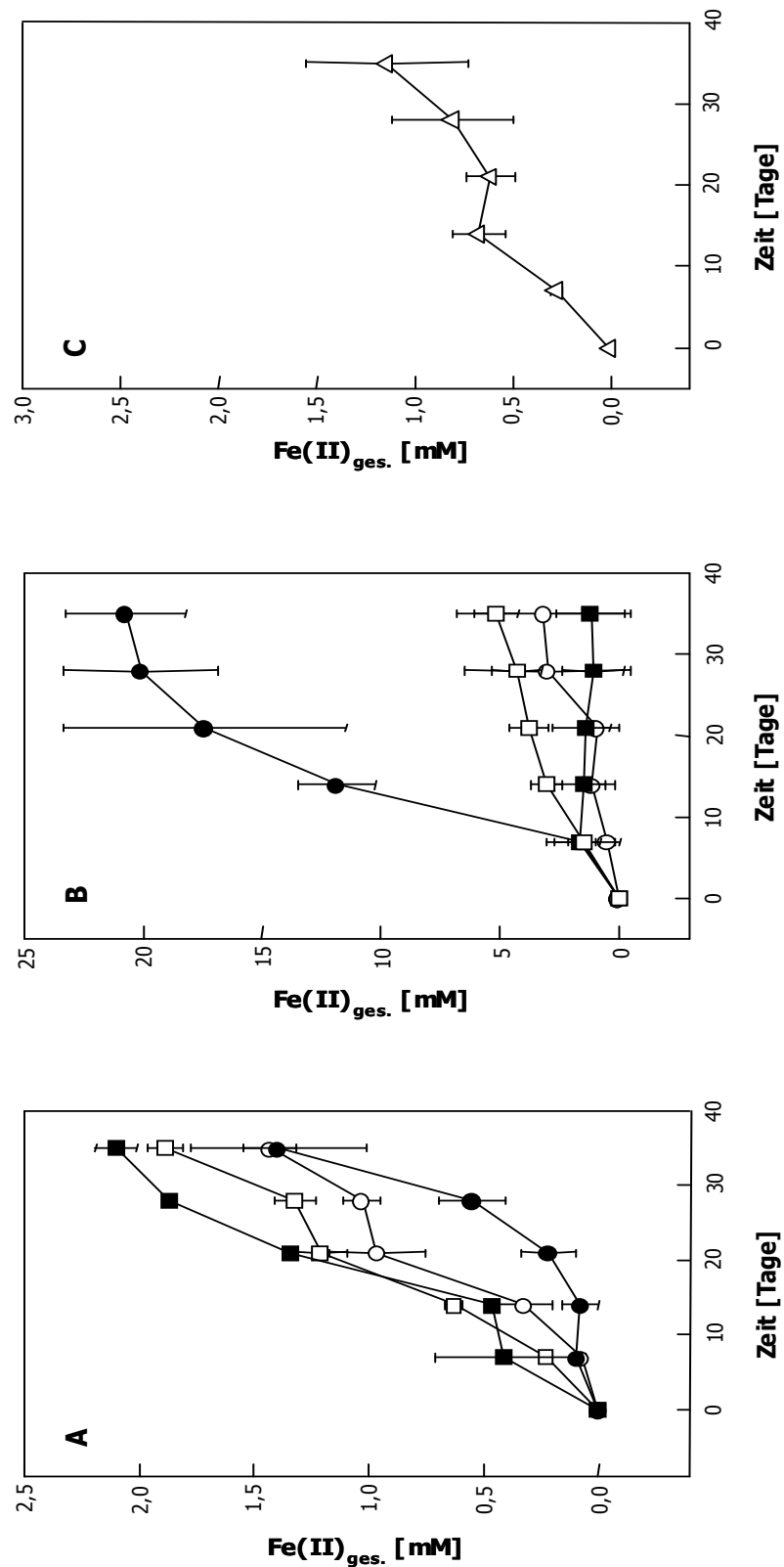
Medium	Zellzahl/ml			
	Ansätze mit Glukose (ca. 2mM)		Kontrollansätze (ohne Glukose)	
	t_0	t_{Ende}	t_0	t_{Ende}
pH3/Fe(OH) ₃	$8,61 \times 10^3$ (± 515)	$7,71 \times 10^3$ (± 712)	$7,01 \times 10^3$ (± 465)	$6,86 \times 10^3$ (± 419)
pH5/Fe(OH) ₃	$8,71 \times 10^3$ (± 701)	$7,51 \times 10^3$ (± 467)	$7,35 \times 10^3$ (± 571)	$7,22 \times 10^3$ (± 613)
pH3/Goethit	$6,11 \times 10^3$ (± 409)	$6,31 \times 10^3$ (± 231)	$7,01 \times 10^3$ (± 921)	$6,78 \times 10^3$ (± 638)
pH5/Goethit	$8,01 \times 10^3$ (± 1083)	$7,21 \times 10^3$ (± 1022)	$6,69 \times 10^3$ (± 831)	$7,04 \times 10^3$ (± 652)
pH3/FeCitrat	$7,89 \times 10^3$ (± 662)	$9,20 \times 10^3$ (± 659)	$8,13 \times 10^3$ (± 727)	$7,89 \times 10^3$ (± 571)
pH5/FeCitrat	$8,67 \times 10^3$ (± 1120)	$7,69 \times 10^3$ (± 926)	$7,52 \times 10^3$ (± 420)	$7,61 \times 10^3$ (± 465)
pH3/FePP _i	$7,41 \times 10^3$ (± 873)	$8,63 \times 10^3$ (± 682)	$6,97 \times 10^3$ (± 1021)	$7,32 \times 10^3$ (± 532)
pH5/FePP _i	$9,41 \times 10^3$ (± 714)	$9,61 \times 10^3$ (± 386)	$7,74 \times 10^3$ (± 1163)	$7,31 \times 10^3$ (± 342)
pH2,2/FeSO ₄	$7,98 \times 10^3$ (± 834)	$4,61 \times 10^3$ (± 1201)	$8,80 \times 10^3$ (± 755)	$8,16 \times 10^3$ (± 1175)

Tabelle 3.6 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen in den Kontrollansätzen. Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelmessungen.

Fe(III)-Quelle	$\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ [mM] zu den Messzeitpunkten [Tage]		
	t_0	t_{21}	t_{35}
Fe(OH)_3 – pH 3	0,03	0,02	0,08
Fe(OH)_3 – pH 5	0,01	0,04	0,10
Goethit – pH 3	0,05	0,02	0,08
Goethit – pH 5	0,02	0,07	0,08
FePPi – pH 3	0,09	0,04	1,12
FePPi – pH 5	0,21	0,15	2,17
FeCitrat – pH 3	0,34	0,42	4,10
FeCitrat – pH 5	0,22	0,21	6,12
$\text{Fe(III)}_3(\text{SO}_4)_2$	0,07	0,06	0,12

In allen Ansätzen konnte im Versuchsverlauf eine Abnahme in der Glukosekonzentration gemessen werden. Dieser lag zwischen 0,63 und 1,82 mM. Die Wiederfindung der Elektronen aus der verbrauchten Glukose ergab Werte zwischen 5,1 und 47,4%, wobei die höchsten Wiederfindungsraten bei FeCitrat mit 47,4% und FePPi mit 20,6% errechnet wurden (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Bis auf Goethit wurden bei allen Fe(III) -Formen höhere Wiederfindungsraten bei pH 5 errechnet.

Als dominierende Gärungsprodukte konnten Acetat, Succinat, Ethanol und Laktat gemessen werden. Acetat konnte bis auf die Ansätze Goethit - pH 5 und FeCitrat – pH 3 in allen Ansätzen zum Zeitpunkt t_{35} nachgewiesen werden. Laktat wurde in allen pH 5 Ansätzen sowie in FePPi – pH 3 nachgewiesen, wobei bei diesem Ansatz nur in einer von drei Proben Laktat nachgewiesen werden konnte. Succinat konnte bis auf in $\text{Fe(III)}_3(\text{SO}_4)_2$ in allen Ansätzen nachgewiesen werden (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Bei den Ansätzen mit FePPi betrug die Acetat-Konzentration zum Zeitpunkt t_1 2,6 mM ($\pm 0,20$ mM) bei pH 3 und 2,8 mM ($\pm 0,18$ mM) bei pH 5. Dieses Acetat liegt als Verunreinigung im Medium vor. Zum Versuchsende kam es hierbei zu einer Zunahme um 0,3 bzw. 1,02 mM. Citrat liegt ebenfalls als Verunreinigung in Medien mit FePPi vor (KÜSEL PERS. MITTEILUNG). Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In den FeCitrat-Medien konnte hingegen Citrat nachgewiesen werden, aufgrund der zu hohen Konzentration im Medium aber nicht quantifiziert werden. Da keine Bestimmung von CO_2 und H_2 vorgenommen wurde, kann keine Kohlenstoffbilanz aufgestellt werden.

**Abbildung 3.12**

Fe(II)_{ges.}-Freisetzung aus unterschiedlichen Fe(III)-Quellen bei pH 3 und 5 unter anoxischen Bedingungen durch *A. capsulatum* bei 30°C mit Glukose (2 mM) als Elektronendonator. (A) □ Goethit pH 3; ■ Goethit pH 5; ○ Fe(OH)₃ pH 3; ● Fe(OH)₃ pH 5; (B) □ FePPi pH 3; ■ FePPi pH 5; ○ FeCitrat pH 3; ● FeCitrat pH 5 (C) △ Fe(III)₃(SO₄)₂ pH 2,2.

3.10 Nachweis der 16S rDNA von azidophilen und neutrophilen Fe(III)-Reduzierern und von Acidobakterien über eine 'Verdünnungs-PCR'.

Die für die 'Verdünnungs-PCR' durchgeführten PCR-Reaktionen ergaben mit den Primer-Sets Acido594F/Acido1150R und Ferro458F/Ferro1473R für die azidophilen und mit den Primer-Sets GM3/Geo825R und Gb564/Gb1290 für die neutrophilen Fe(III)-Reduzierer ein PCR-Produkt mit DNA extrahiert aus allen drei Zonen (Abbildung 3.13). Für die *Acidiphilium*-Spezies konnte ein PCR-Produkt in allen Sedimentzonen bis zur Verdünnungsstufe von 10^{-2} erhalten werden. Für die 'Bioleaching-Assoziierten' Bakterien konnte in allen Sedimentzonen nur mit der unverdünnten Roh-DNA (Verdünnungsstufe 10^0) ein positives PCR-Produkt erhalten werden.

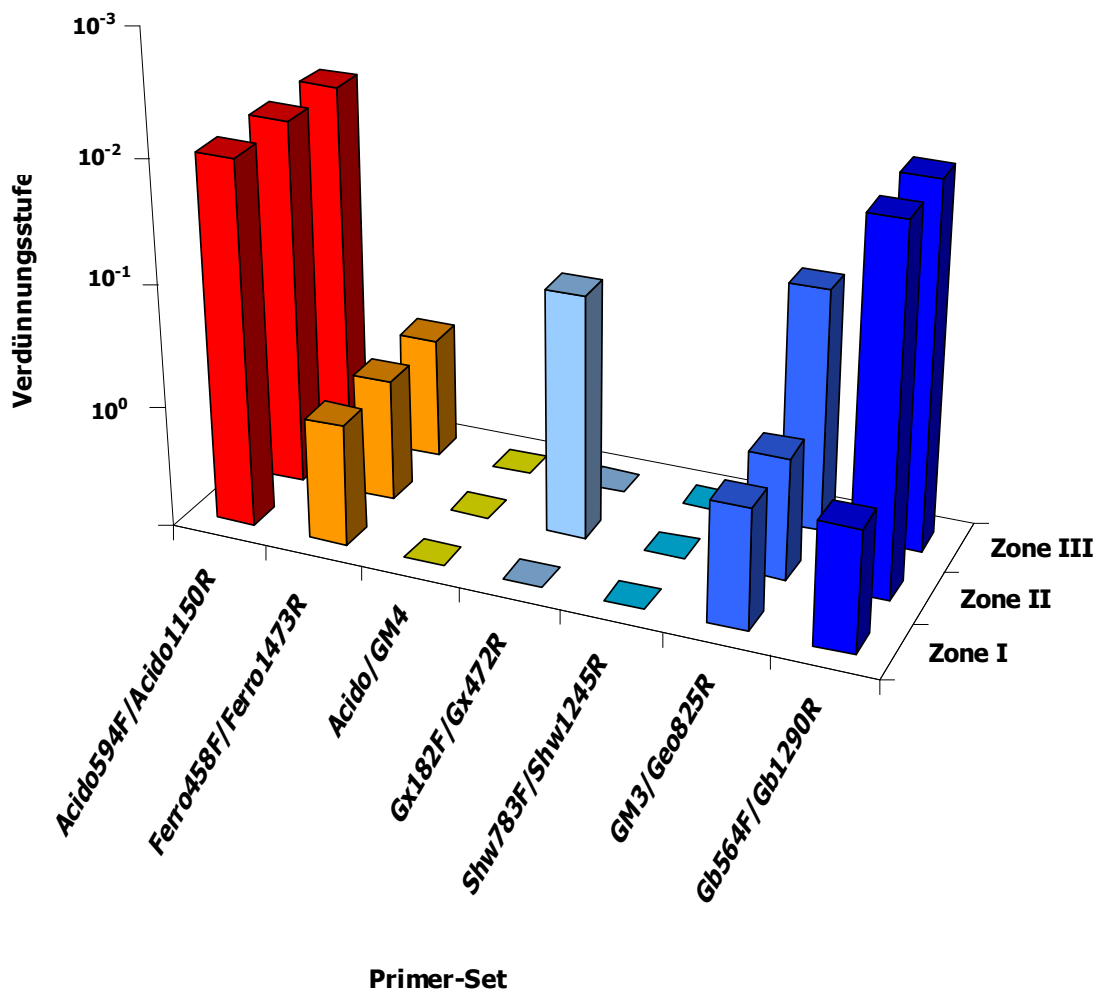


Abbildung 3.13 Nachweis des Vorkommens von bestimmten Bakteriengruppen über eine Verdünnungs-PCR mit gruppenspezifischen Primern.

Während für die azidophilen Fe(III)-Reduzierer mit dieser Methode kein Unterschied zwischen den einzelnen Sedimentzonen ermittelt werden konnte, zeigte sich bei den neutrophilen Fe(III)-Reduzierern ein Unterschied in Bezug auf die Sedimenttiefe. Mit dem Primer-Set GM3/Geo825R für *Geobacter* konnte ein positives Signal in Zone III bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} erhalten werden. In Zone I und Zone II lag die höchste positive Verdünnungsstufe bei 10^0 . Mit dem Primer-Set Gb564/Gb1290 ergab sich ein leicht abgewandeltes Bild. Mit diesem Primer-Set lag die höchste positive Verdünnungsstufe in Zone II und Zone III bei 10^{-2} . Hingegen konnte in Zone I nur mit der unverdünnten DNA ein positives Signal erhalten werden. Bei den neutrophilen Fe(III)-Reduzierern zeigte sich im Gegensatz zu den azidophilen Fe(III)-Reduzierern ein „größeres“ Vorkommen bei pH 5,5 im Vergleich zu pH 3.

Mit den für *Geothrix* spezifischen Primern Gx182F/Gx472R konnte nur in Zone II bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} ein positives Signal erhalten werden. Kein positives Signal konnte mit den Primern für *Shewanella* und *Acidobacterium* erhalten werden. Für *Shewanella* konnte jedoch über eine Nested-PCR in allen Zonen ein positives Signal erhalten werden.

3.11 Klonierung, RFLP-Screening und phylogenetische Analyse der mit den spezifischen Primern für Fe(III)-Reduzierer erhaltenen PCR-Produkte

3.11.1 Phylogenetische Analyse der erhaltenen *Acidiphilium*-Klonsequenzen

Insgesamt konnten aus 50 *Acidiphilium*-16S rDNA Klonen (22 aus Zone I und 28 aus Zone III) über RFLP acht unterschiedliche Phylotypen differenziert werden. Von diesen acht Phylotypen konnten vier sowohl in Zone I als auch in Zone III nachgewiesen werden. Die restlichen vier Phylotypen wurden hingegen nur in Zone III nachgewiesen. Ein Sequenzvergleich der vier Phylotypen aus Zone I und Zone III mit der EMBL-Datenbank ergaben ausschließliche Ähnlichkeiten von 99% zu *Acidiphilium*-Spezies (siehe Tabelle 6.3). Die Sequenzen der vier Phylotypen, die ausschließlich in der Klonbibliothek aus Zone III gefunden wurden, waren hingegen zu 95% sequenzähnlich zu kultivierten *Acidiphilium*- oder *Acidisphaera*-Spezies. Eine phylogenetische Analyse der erhaltenen acht Sequenzen ergab zwei Gruppen (Abbildung 3.14). Gruppe 1 enthält die Phylotypen, die nur in Zone III gefunden wurden. Die Phylotypen von Zone I und Zone III gruppieren sich in Gruppe 2.

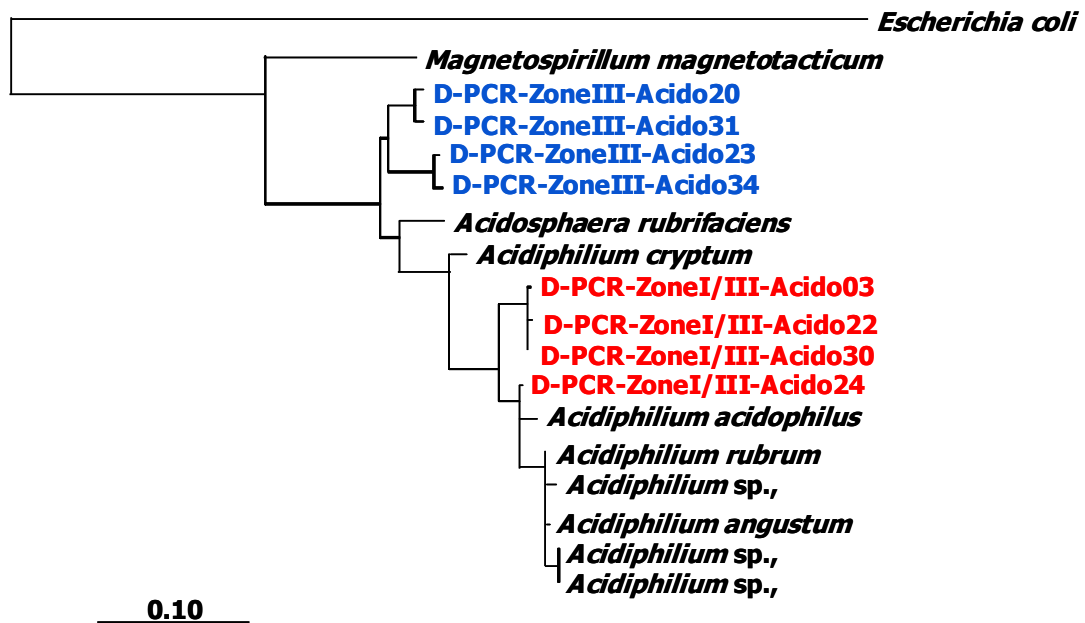


Abbildung 3.14 Phylogenetische Verwandtschaft der *Acidiphilium*-Klone aus Zone I und Zone III. Die blauen Klone wurden ausschließlich in der Klonbibliothek aus der Zone III, die roten Klone aus den Klonbibliotheken aus den Zonen I und Zone III erhalten.

3.11.2 Phylogenetische Analyse der erhaltenen 'Bioleaching'-Klonsequenzen

Für die 'Bioleaching-Assoziierten'-16S rDNA wurden 20 Klone aus Zone I und 28 Klone aus Zone III auf redundante Klone über RFLP gescreent. Hierbei konnte insgesamt nur 1 Phylotyp unterschieden werden (siehe Tabelle 6.3). Die ermittelte Sequenz zeigt eine 99%ige Sequenzähnlichkeit mit *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 13598.

3.11.3 Phylogenetische Analyse der erhaltenen *Geobacter*-Klonsequenzen

Für die *Geobacter*-16S rDNA (mittels Primer-Set Gb564/Gb1290) konnten 47 Klone aus Zone I und 76 Klone aus Zone III ermittelt werden. Über RFLP-Screening konnten hieraus 38 Phylotypen in Zone I und 52 Phylotypen in Zone III bestimmt werden. Von diesen wurden 20 Phylotypen aus Zone I und 40 Phylotypen aus Zone III sequenziert und gegen die 16S rDNA-EMBL-Datenbank über einen BLAST-Search abgeglichen (siehe Tabelle 6.1). Es konnte nur eine einzige Sequenz der *Geobacter*-Gruppe mit einer Sequenzähnlichkeit von 97% zu *Geobacter* sp. zugeordnet werden. Die restlichen Phylotypen zeigten Sequenzähnlichkeiten zu *Acidobacterium* sp. (89-97%), *Streptococcus* (90-99%), *Propionibacterium* (97%), *Ferromicrobium* (92%) und *Actinomyces* (94%). Daher wurde der Klonierungsschritt mit dem *Geobacter* PCR-Produkt mit dem Primer-Set GM3/Geo825R wiederholt. Hieraus konnten insgesamt 80 Klone aus Zone III erhalten werden. Hierbei ergab

das RFLP-Screening 33 unterschiedliche Phylotypen. Hiervon konnten nach dem Abgleich mit der EMBL-Datenbank vier Sequenzen der *Geobacter*-Gruppe zugeordnet werden (siehe Tabelle 6.2). Ein Phylotyp von diesen vier zeigte eine Sequenzähnlichkeit von 90% zu *Geobacter grbicum* (90%). Die restlichen drei Sequenzen waren mit 93-97% sequenzähnlich zu *Geobacter* sp. CdA-2 (CUMMINGS ET AL. 1999). Die restlichen Sequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu *Syntrophobacteraceae* (91-96%), *Desulfobacteriaceae* (91-93%), *Magnetobacterium* sp. (85%), *Acidobacterium* sp. (92%) und *Actinomyces* sp. (91%).

Von den übrigen 29 erhaltenen Sequenzen fielen 26 Sequenzen in die Gruppe der δ -Proteobakterien (Abb. 3.16). 13 dieser 26 Sequenzen gehören mit *Syntrophobacter wolinii* und den Klonsequenzen K-4b1 und SJA-172 zusammen. Klon K-4b1 wurde aus einem säuretoleranten methanogenen Konsortium isoliert (SIZOVA ET AL. 2003). Klonsequenz SJA-172 stammt aus einem Flüssigbettreaktor (FBR) zur Dechlorinierung von Trichlorbenzol (VON WINTZINGERODE ET AL. 1999).

Die vier Klonsequenzen D_PCR_ZoneIII-Geo16, 41, 46 und 47 gruppieren sich zusammen mit *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfomonile liminaris*, *Desulfobacterium anilini* sowie den Klonsequenzen Btol und GCA017. Klon D_PCR_ZoneIII-Geo16 ist dabei mit *Desulfobacterium anilini* phylogenetisch am nächsten verwandt. Klonsequenz Btol stammt aus einem marinen Sediment (SUN ET AL. 2001). Klonsequenz GCA017 stammt aus einem mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Sediment (veröffentlicht in EMBL 1999 von O'NEILL ET AL.). Vier Klonsequenzen fallen in die Gruppe der *Geobacter*. Während Klon D_PCR_ZoneIII-Geo1 sich als Außengruppe zu den *Geobacter* darstellt, weisen die Klone D_PCR_ZoneIII-Geo 17, 22 und 23 zusammen mit den Klonsequenzen Common_ZoneI-15 und Common_ZoneIII-41 eine größere phylogenetische Verwandtschaft mit *Pelobacter propionicus* auf.

Klon D_PCR_ZoneIII-Geo25 bildet zusammen mit *Desulfobacterium indolicum* und der Klonsequenz LA30-B27 eine Gruppe. Die Klonsequenz LA30-B27 wurde aus einem hypersalinen See auf dem Pearl Atoll (Hawaii) isoliert (veröffentlicht in EMBL 2002 von DONACHIE ET AL.). Klon D_PCR_ZoneIII-Geo11 bildet zusammen mit *Syntrophus acidotrophicus*, der Klonsequenz 36-11 und der Klonsequenz Common_ZoneIII-CloneF6 aus der allgemeinen Klonbibliothek, eine Gruppe. Die Sequenz für Klon 36-11 stammt aus einem mit Steinkohleteer kontaminierten Grundwasserleiter (BAKERMANS UND MADSEN 2002). Trotz der relativ stringenten Bedingungen bei der PCR wurden viele 16S rRNA-Gene erhalten, die nicht zu den *Geobacteraceae* zählen. Primer Gb564F zeigte beim Abgleich mit der Datenbank nur mit *Geobacter pelophilus* an Position 1 des Primers eine Fehlpaarung. Primer Gb1290R zeigte hingegen mit allen zu den *Geobacter* gehörigen Sequenzen 3-5 Fehlpaarungen. Primer Geo825R zeigten mit den *Pelobacter* 2-3 Fehlpaarungen, mit den *Geobacter* hingegen 1-2 Fehlpaarungen.

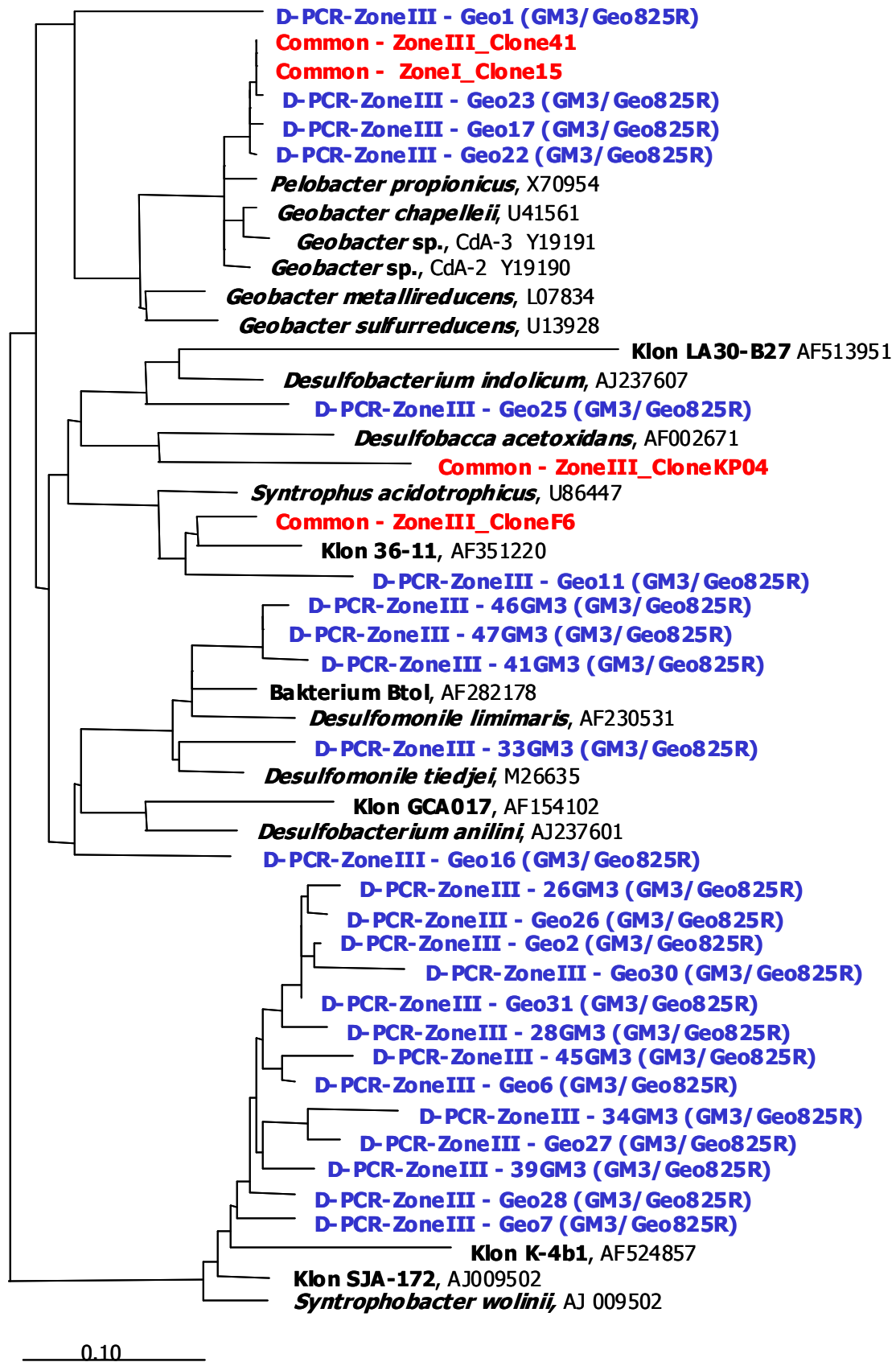


Abbildung 3.15 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der mit den *Geobacter*-Primern erhaltenen Klonsequenzen (blau). Zusätzlich zu diesen Klonsequenzen sind die Klonsequenzen aus der allgemeinen Klonbibliothek (siehe 3.5) aufgeführt.

3.11.4 Phylogenetische Analyse der *Geothrix*- und *Shewanella*-Klonsequenzen

Mit dem erhaltenen PCR-Produkt für *Geothrix* wurden 12 Klone von Zone II erhalten. Von diesen wurden 9 Klone ohne ein vorheriges Klonscreening zur Sequenzierung verschickt. Nur einer dieser Klone zeigte eine Sequenzähnlichkeit zu *Geothrix fermentans* mit einem Wert von 95% (siehe Tabelle 6.3). Mit dem über die nested-PCR erhaltenen PCR-Produkt für *Shewanella* konnten 8 Klone erhalten werden. Von diesen zeigte nur ein Klon mit 93% eine Sequenzähnlichkeit zu *Shewanella alga*. Die restlichen Klone wiesen Ähnlichkeiten zu *Sterolibacterium denitrificans* (~95%) und *Chromobacterium* sp. (89-95%) auf.

3.11.5 Bestimmung der Acidobakterien im Sediment von Restsee 77

Mit den für die Acidobacteria der Gruppe I spezifischen Sonde IRog1 und IRog2 konnte im Sediment (Probenahme vom 15.07.2003) von Restsee 77 über eine Tiefe von 0 bis 22,5 cm kein positives Signal für die Acidobacteria erhalten werden. Eine Überprüfung der FISH-Methode an einer 2 Wochen alten *A. capsulatum* Reinkultur ergab im Vergleich zur DAPI-Färbung eine Effizienz von 89%.

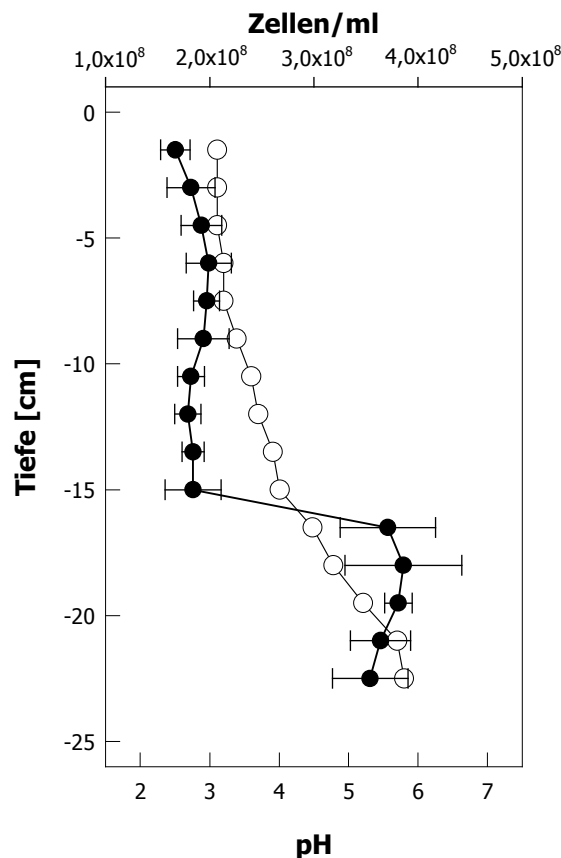


Abbildung 3.16 Verlauf der Zellzahl und des pH im Sediment von Restsee 77. (●), Zellen/ml DPI; (○) pH-Wert.

Die Tatsache, dass mit den verwendeten Sonden IRog1 und IRog2 kein positives Signal in den Sedimentproben aus den Zonen I und III erhalten werden konnte, war überraschend, da Klonsequenzen der Acidobakterien die erstellten allgemeinen Klonbibliotheken aus der Zone I und Zone III dominierten. Wie die phylogenetische Untersuchung der Klonsequenzen ergab, fielen diese überwiegend in die Gruppe I (siehe 3.5.3), für die die verwendeten Sonden spezifisch sind. Daher wurden die erhaltenen Klonsequenzen aus der Gruppe der Acidobakterien auf eine Übereinstimmung mit den Sequenzen der Sonden überprüft. Es wurden maximal 2 Fehlpaarungen ermittelt. Da das Sediment kohlenstofflimitiert ist, können sich die Zellen in einem Zustand geringer Stoffwechselaktivität befinden, was sich unter anderem durch eine verringerte Anzahl an Ribosomen in den Zellen auszeichnet. Dies führt zu einem geringen Signal bei der *in situ* Hybridisierung, da die Signalstärke abhängig von der Anzahl der 16S rRNA-Kopien in den Zellen ist (AMANN ET AL. 1995).

Hypothese III: Der an die Fe(III)-Minerale sorbierte Kohlenstoff im sauren Sediment von Restsee 77 kann als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion dienen.

Sowohl bei der Sulfat- als auch bei der Eisenreduktion wird mikrobiell verfügbarer Kohlenstoff (CH_2O) als Elektronendonator benötigt. Aufgrund der geringen Biomasseproduktion in Restseen (GYURE ET AL. 1987, NIXDORF UND KAPFER 1998) ist jedoch anzunehmen, dass nur geringe Mengen verfügbaren Kohlenstoffs in das Sediment gelangen. Die hohen Fe(III)-Reduktionsraten in der Zone I haben den Effekt, dass aus der Wassersäule absedimentierter organischer Kohlenstoff weitgehend in den oberen Sedimentschichten bei der Fe(III)-Reduktion abgebaut wird. Somit bleibt die Frage, welcher Kohlenstoff die mikrobiellen Prozesse in den tieferen Sedimentschichten antreibt (KÜSEL ET AL. 2002). Untersuchungen zum Kohlenstoffpool haben gezeigt, dass die partikuläre Braunkohle im Restsee 77 keine inerte Kohlenstofffraktion darstellt und ein für mikrobielle Prozesse günstiges C/N-Verhältnis aufweist (NOHLEN 1999).

Mit zwei methodisch unterschiedlichen Ansätzen wurde untersucht, in wieweit der kohlebürtige Kohlenstoff zur Eisenreduktion verwendet werden kann. Es wurden aus den Zonen I und III eine Huminstoff-Lösung extrahiert (siehe 2.2.3), die zur Stimulierung der Eisenreduktion in Mikrokosmen als auch zur Gewinnung von Anreicherungskulturen und Isolaten benutzt wurde.

In einem weiteren Ansatz wurde der an die Eisenminerale gebundene Kohlenstoff zu einer Anreicherungskultur zugesetzt. Eine einsetzende Eisenreduktion kann darauf hinweisen, dass der sorbierte organische Kohlenstoff oxidiert wurde.

3.12 Analyse der aus Zone I und Zone III extrahierten Huminstoff-Lösung

Die aus Zonen I und Zone III extrahierten Huminstoff-Lösungen hatten einen DOC-Gehalt von 161,0 bzw. 232,0 mg/L (siehe Tabelle 6.4). Der Anteil der natürlichen hydrophoben Stoffe (HOC = Hydrophobic Organic Carbon) lag in der Zone I-Lösung bei 7,4% und in der Zone III-Lösung bei 33,2%. In der Zone III-Lösung setzt sich dieser Anteil wahrscheinlich aus schwerlöslichen Huminen zusammen. Dafür spricht die hohe Aromatizität von 22,2 L/(mg x m). In der Zone I-Lösung ist dieser Wert mit 8,7 L/(mg x m) um den Faktor 3 kleiner.

Der CDOC-Anteil (DOC-HOC) in der Zone III-Lösung setzte sich annähernd im Verhältnis 1:1 aus den zwei Verbindungsklassen Huminstoffe und den Neutralstoffen + Amphiphile

zusammen. Den geringsten Anteil machten mit 2,1 mg/L die niedermolekularen Säuren sowie die Polysaccharide mit 3,6 mg/L aus. Die Molmasse im Peakmaximum betrug ca. 5000 g/mol. Dieser Wert ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den Huminstoffen überwiegend um Huminsäuren handelt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Zone I-Lösung erhalten. Hier überwogen jedoch die Neutralstoffe mit 85,5% über den Huminstoffen mit 12% am CDOC. Die Molmasse im Peakmaximum betrug ca. 4600 g/mol, was ebenfalls für Huminsäuren spricht.

3.13 Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen aus Zone I und Zone III durch Zugabe einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III bei unterschiedlichen pH-Werten

Eine Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung durch die Zugabe von 5 ml einer Huminstoff-Lösung (extrahiert aus Zone III; 232,0 mg/ml DOC) zu Mikrokosmen der Zone I und Zone III (Probennahme 15.07.2003) konnte nur bei einem pH von 5,3 beobachtet werden (Abbildung 3.17).

In den Mikrokosmen der Zone I mit einem pH von 2,9 lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration nach einer Versuchsdauer von 23 Tagen ohne Zugabe einer Huminstoff-Lösung bei 23,4 mM ($\pm 4,3$). Höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen konnten mit 28,4 mM ($\pm 3,4$) durch die Zugabe einer Huminstoff-Lösung gemessen werden. Eine deutlichere Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in der Zone I durch die Zugabe einer Huminstoff-Lösung konnte bei pH 5,3 beobachtet werden. Wurde der pH in den Mikrokosmen der Zone I von 2,9 auf 5,3 eingestellt, betrug die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration ohne Huminstoff-Lösung zu Versuchsende 35,4 mM ($\pm 3,8$). Die Zugabe einer Huminstoff-Lösung ergab bei diesem erhöhten pH eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration von 46,5 mM ($\pm 4,9$).

Der gleiche Effekt konnte in den Mikrokosmen der Zone III beobachtet werden. In den Mikrokosmen der Zone III mit dem *in situ* pH 5,3 lag am Versuchsende mit zugesetzter Huminstoff-Lösung die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration mit 46,1 mM ($\pm 3,9$) deutlich über den Ansätzen ohne Huminstoff-Lösung mit 37,8 mM ($\pm 3,7$). Bei den Mikrokosmen der Zone III mit dem eingestellten pH von 2,9 fiel dieser Unterschied geringer aus. Hier lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration in Gegenwart der Huminstoff-Lösung bei 38,9 mM ($\pm 2,12$) im Gegensatz zu 35 mM ($\pm 2,82$) ohne Huminstoff-Lösung.

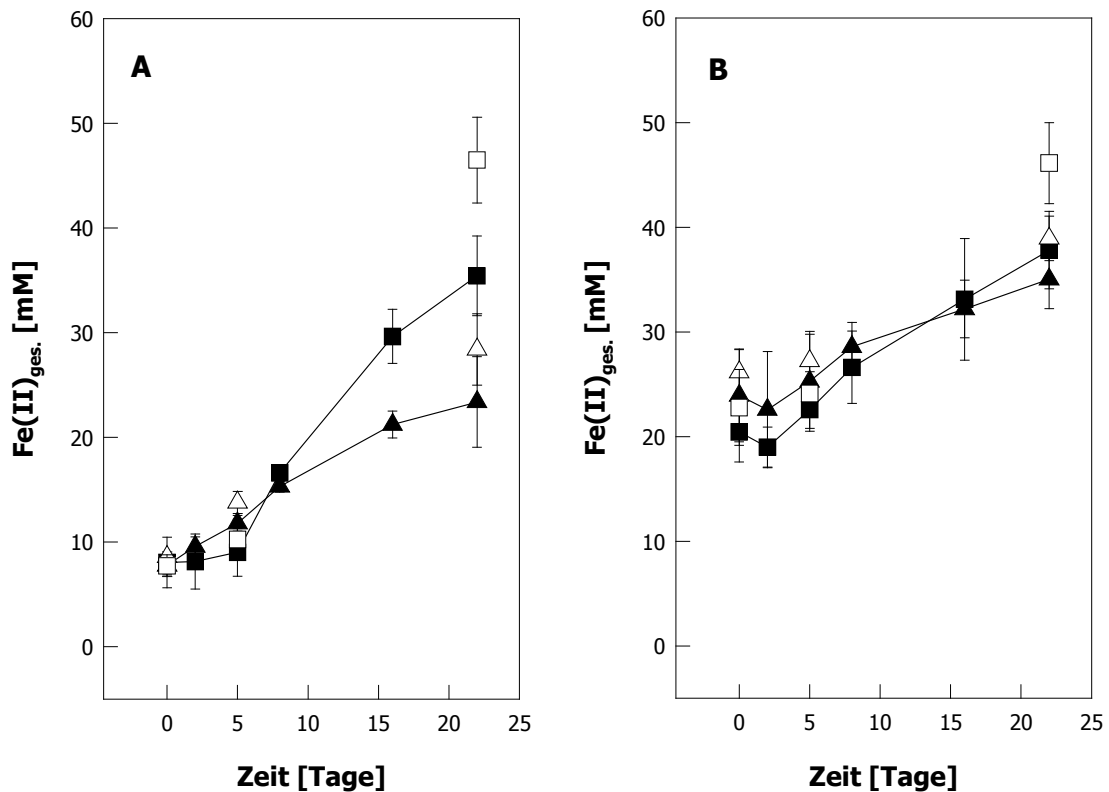


Abbildung 3.17 Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (**A**) und Zone III (**B**) durch Zugabe einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III bei unterschiedlichen pH-Werten. pH 2,9 (▲/△); pH 5,3 (■/□). Die Ausgefüllten Symbole stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen in den Ansätzen ohne Huminstoff-Lösung dar, während die offenen Symbole $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationen in den Ansätzen mit Huminstoff-Lösung darstellen.

In den Zonen I, III und IV wurde die Keimzahl der "huminstoffverwertenden" Fe(III) -Reduzierer pro Gramm Feuchtgewicht über die MPN-Methode in drei Parallelansätzen bestimmt. Hierbei diente jeweils 1 ml einer wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben hergestellten Huminstoff-Lösung (232,0 mg/ml DOC) aus Zone III als Substrat für die Fe(III) -Reduktion. Als Eisenmineral wurde Schwertmannit_{sterilif.} (40 mM) für die MPN-Bestimmung in der Zone I verwendet. Für die MPN-Bestimmung in Zone III und Zone IV wurde Goethit (40 mM) verwendet. Die Auswertung der MPN-Ansätze erfolgte über die Messung von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$. Als positiv wurden die Röhrchen bewertet, die zum Versuchsende eine höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration als die entsprechenden Kontrollansätze aufwiesen. Die MPN-Bestimmungen in den Zonen I und III erfolgten bei pH 3 und 5,5, die in Zone IV bei pH 5,5.

Die Keimzahl für die Zone I lag mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zwischen $4,92 \times 10^1$ und $1,08 \times 10^3$ Zellen/gFG. Unter pH 5,5-Bedingungen konnten keine signifikant höheren Keimzahlen bestimmt werden. In Zone III erfolgte die Keimzahlbestimmung mit Goethit

(40 mM) bei pH 3 und 5,5. In diesen Ansätzen lag die Keimzahl mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zwischen $1,92 \times 10^4$ und $4,21 \times 10^5$ Zellen/gFG. Höhere Keimzahlen konnten in Zone III bei pH 5,5 ermittelt werden. Bei diesem pH lagen die Keimzahlen zwischen $4,49 \times 10^5$ und $9,82 \times 10^6$ Zellen/gFG. In der Zone IV lagen die ermittelten Keimzahlen bei pH 5,5 zwischen $4,92 \times 10^3$ und $1,08 \times 10^5$ Zellen/gFG. Die Keimzahlen in Zone IV unter pH 3-Bedingungen wurden nicht bestimmt.

In den MPN-Ansätzen aus Zone I mit Schwertmannit_{sterilf.} bei pH 5,5 konnte in zwei von drei Röhrchen der Verdünnungsstufe 10^{-2} sowie in einem Röhrchen der Verdünnungsstufe 10^{-3} eine schwarze Verfärbung in den oberen 1 mm der Fe-Festphase beobachtet werden. Die gleiche Beobachtung konnte in den MPN-Ansätzen aus Zone III in zwei von drei Röhrchen der Verdünnungsstufe 10^{-3} bei pH 5,5, sowie in den MPN-Ansätzen aus Zone IV in einem Röhrchen der Verdünnungsstufe 10^{-2} werden. Eine derartige schwarze Verfärbung konnte in keinem der MPN-Kontrollansätze beobachtet werden. Dies ließ sich als ein Hinweis auf eine mögliche Sulfatreduktion deuten. Zum Versuchsende wurde aus den MPN-Ansätzen, die eine derartige schwarze Verfärbung der Fe(III)-Festphase aufwiesen, eine Probe (1 ml) für die TRIS-Bestimmung gezogen. Als Kontrolle wurde eine Probe (1 ml) aus den entsprechenden MPN-Kontrollansätzen genommen (MPN-Kontrollansatz I: mit Inokulum, ohne Huminstoff-Lösung; MPN-Kontrollansatz II: ohne Inokulum, mit Huminstoff-Lösung). Die TRIS-Bestimmung in den MPN-Ansätzen ergab folgende Ergebnisse:

MPN-Ansatz Zone I (Schwertmannit _{sterilf.} , 10^{-3} , pH 5,5)	157 μmol TRIS
MPN-Ansatz Zone III (Goethit, 10^{-3} , pH 5,5)	85 bzw. 51 μmol TRIS
MPN-Ansatz Zone IV (Goethit, 10^{-2} , pH 5,5)	75 μmol TRIS

Das lässt vermuten, dass in den MPN-Ansätze eine Bildung von reduzierten Schwefelverbindungen stattgefunden hat. Als Ursache hierfür kann eine Sulfatreduktion angenommen werden. Da die MPN-Ansätze zur Erfassung der Fe(III)-Reduzierer, nicht aber für die Sulfatreduzierer ausgelegt waren, wurde zu Versuchsbeginn und Versuchsende lediglich die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration, nicht jedoch die Sulfatkonzentration ermittelt. Daher liegen auch keine Werte für eine mögliche Abnahme in der Sulfatkonzentration vor, was als ein weiteres Indiz für die vermutete Sulfatreduktion hätte gewertet werden können. In den Kontrollansätzen konnten über die Messung von TRIS keine reduzierten Schwefelverbindungen nachgewiesen werden.

Tabelle 3.7 Bestimmung der Keimzahlen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% von Huminstoff-Verwertenden Fe(III)-reduzierenden Mikroorganismen in den Zonen I, III und IV von Restsee 77.

Zone	Fe(III)-Quelle	pH	Keimzahl [Zellen/gFG]	
			untere Grenze	obere Grenze
I	Schwertmannit _{sterilif.}	3	$4,92 \times 10^1$	$1,08 \times 10^3$
I	Schwertmannit _{sterilif.}	5,5	$8,34 \times 10^1$	$3,24 \times 10^3$
III	Goethit	3	$1,92 \times 10^4$	$4,21 \times 10^5$
III	Goethit	5,5	$4,49 \times 10^5$	$9,82 \times 10^6$
IV	Goethit	5,5	$4,92 \times 10^3$	$1,08 \times 10^5$

3.14 Anreicherungskulturen MB_{HZIII} und MB_{HZIV}

Aus den höchsten positiven MPN-Ansätzen mit der Huminstoff-Lösung aus Zone III als Substrat für die Fe(III)-Reduktion wurden Anreicherungskulturen angelegt. Aus den Zone III-MPN-Ansätzen (10^{-3}) und den Zone IV-MPN-Ansätzen (10^{-2}) konnten die Anreicherungskulturen MB_{HZIII} und MB_{HZIV} mit einer stabilen Fe(III)-Reduktion über 4 Transfers gewonnen werden. Aus den Zone I-MPN-Ansätzen (10^{-3}) konnte keine stabile Anreicherungskultur erhalten werden, da in MB_{HZI} bereits nach dem ersten Transfer keine Fe(II)_{ges.}-Freisetzung mehr beobachtet werden konnte.

In den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} und MB_{HZIV} konnte mit 1 ml einer Huminstoff-Lösung aus Zone III (16,1 mg/ml) im 5. Transfer eine Fe(II)_{ges.}-Freisetzung über eine Zeitspanne von 35 Tagen bei einem pH von 5,5 beobachtet werden. Diese setzte in beiden Kulturen ohne eine zeitliche Verzögerung ein (Abbildung 3.18). In beiden Anreicherungskulturen konnte ein vergleichbare Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsrates von 79 bzw. 82 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ berechnet werden. Im Vergleich hierzu konnte die Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in den biologischen bzw. chemischen Kontrollansätzen vernachlässigt werden. Die Huminstoff-Analyse aus diesen Ansätzen ergab für MB_{HZIII} eine Zunahme der niedermolekularen Säuren. Während die Verbindungsklasse zu Versuchsbeginn nicht nachgewiesen werden konnte, lag sie zu Versuchsende bei 1,9 mg/L. Für MB_{HZIV} konnte derartige nicht beobachtet werden.

Mit den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} und MB_{HZIV} konnte ebenfalls eine Fe(II)_{ges.}-Freisetzung bei der Verwendung einer Huminstoff-Lösung aus der Zone I bei pH 3 und pH 5,5 beobachtet werden (Abbildung 3.19). Bei pH 5,5 kam es beiden Anreicherungskulturen nach ca. 10 Tagen zu einer Fe(II)_{ges.}-Freisetzung. Die Freisetzungsrates betrugen für MB_{HZIII}

$131 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und für MB_{HZIV} $100 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Im Vergleich zu pH 5,5 setzte bei pH 3 die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung erst nach ca. 20 Tagen ein. Bei Anreicherungskultur MB_{HZIV} lag die Freisetzungsrate bei $170 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$; bei MB_{HZIII} lag sie bei $62 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

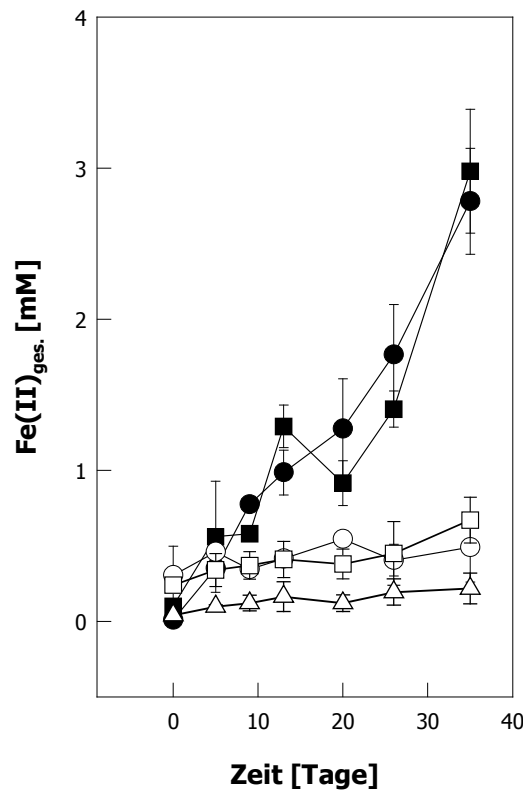


Abbildung 3.18 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} (●) und MB_{HZIV} (■) mit einer Huminstoff-Lösung aus der Zone III als Substrat für die Fe(III) -Reduktion bei pH 5,5. Die offenen Symbole (○/□) stellen die Messwerte der Kontrollansätze zu MB_{HZI} und MB_{HZIII} ohne Huminstoff-Lösung dar, während (△) die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in der chemischen Kontrolle wiedergibt. Dargestellt sind die Messwerte und die Standardabweichung von zwei Parallelansätzen.

Da die zur Verfügung stehende Messzeit für die Huminstoff-Analyse begrenzt war, konnte nur eine geringe Anzahl an Proben analysiert werden. Die in Tabelle 6.4 dargestellten Messwerte stellen Einzelmessungen dar. Aus diesem Grund konnte zum einen nicht aus allen Ansätzen eine Proben analysiert werden; zum anderen war keine Mehrfachbestimmung möglich. Eine Verifizierung der gewählten Huminstoff-Extraktionsmethode aus den Versuchsansätzen war nicht möglich. Die ermittelten Unterschiede können somit auch durch eine unterschiedliche Extraktionseffizienz entstanden sein. Dagegen sprechen jedoch die relativ ähnlichen Huminstoff-Werte zu den Zeitpunkten t_0 und t_E .

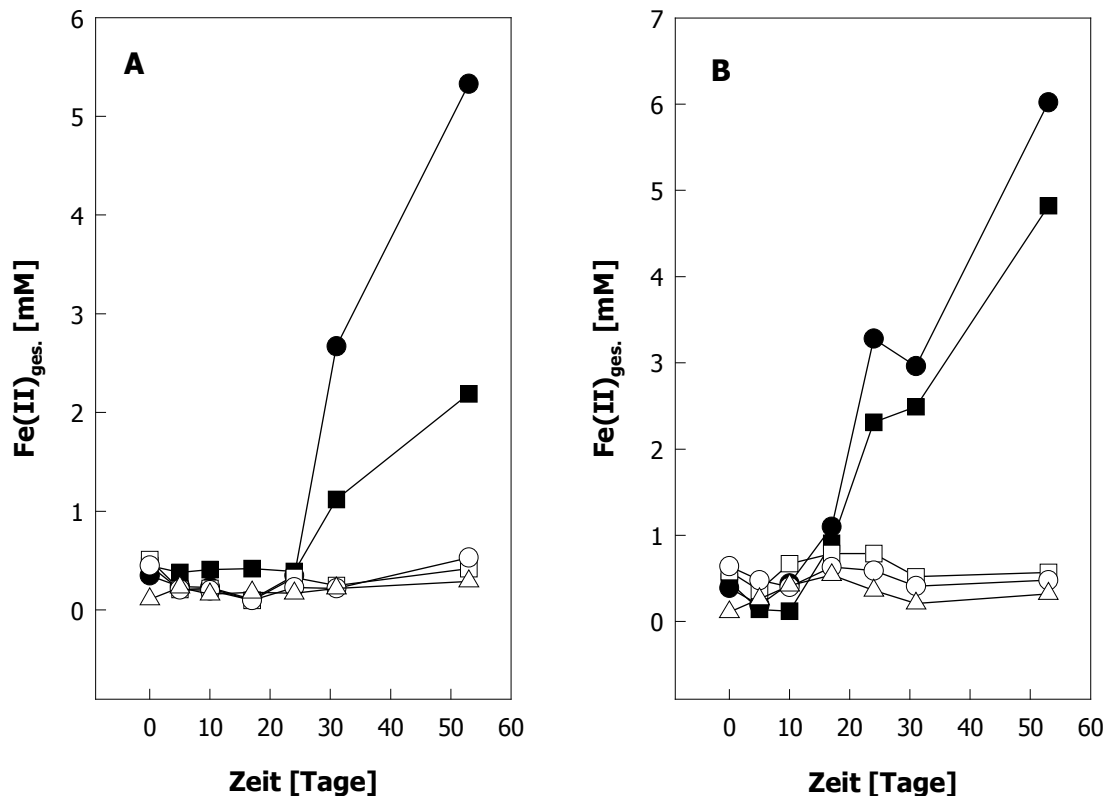


Abbildung 3.19 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} (●) und MB_{HZIV} (■) mit einer Huminstoff-Lösung aus der Zone I bei pH 3 (A) und pH 5,5 (B). Die offenen Symbole (○/□) stellen die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Ansätzen ohne Huminstoff-Lösung dar, bzw. in den chemischen Kontrollen ohne Inokulum (△). Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelmessungen.

Zur genaueren Charakterisierung der Anreicherungskulturen wurde zum einen eine Isolierung auf Agar-Platten mit Fe(OH)_3 und Huminstoff-Lösung unternommen. Nach einer Inkubation von 16 Wochen konnte auf allen angeimpften Agar-Platten ein Wachstum beobachtet werden. Insgesamt konnten fünf Isolate erfolgreich mehrfach nur mit einer Huminstoff-Lösung aus Zone III transferiert werden. Eine Beschreibung der erhaltenen Isolate gibt Tabelle 3.8. Die Isolate KF1 bis KF3 aus der Anreicherungskultur MB_{HZIII} wiesen alle kleine Kolonien (< 1 mm) auf. Bei KF1 und KF2 konnte eine Hofbildung erkannt werden. Hier kam es um die Kolonien herum zu einer Auflösung des Fe(III) -Minerals. Bei KF3 konnte keine Hofbildung erkannt werden. Bei den Isolaten KF4 und KF5 aus der Anreicherungskultur MB_{HZIV} konnte nur bei KF4 eine Hofbildung erkannt werden. Eine molekulare Charakterisierung dieser Isolate konnte nicht erfolgen, da aus diesen Isolaten keine amplifizierbare DNA isoliert werden konnte.

Tabelle 3.8 Beschreibung der Isolate KF1 bis KF5 aus den Anreicherungskulturen MB_{HZIII} und MB_{HZIV} mit der Zone III-Huminstoff-Lösung aus Restsee 77.

Kolonie	Herkunft	Durchmesser	Koloniefarbe	Kolonieform	Hofbildung	Zellform
KF1	MB _{HZIII}	< 1 mm	weiß/beige	kreisförmig	Ja	kurze Stäbchen
KF2	MB _{HZIII}	< 1 mm	weiß/beige	kreisförmig	Ja	kurze Stäbchen
KF3	MB _{HZIII}	< 1 mm	grau	kreisförmig	Nein	Stäbchen
KF4	MB _{HZIV}	< 1 mm	weiß/grau	kreisförmig	Ja	Stäbchen
KF5	MB _{HZIV}	< 3 mm	grau	kreisförmig	Nein	gekrümmte Stäbchen

3.15 Verwendung des Kohlenstoffs von Dichtefraktionen aus den Restseen 77 und 116 als Substrat für die Fe(III)-Reduktion

Aus dem Restsee 77 wurden aus den Sedimentbereichen 0-7 cm (H1₇₇) und 15-22 cm (H3₇₇) Material über die Dichtefraktionierung aufgearbeitet. Diese Arbeit wurde an der Limnologischen Station der Universität Bayreuth im geochemischen Teilprojekt durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden für mikrobiologische Experimente zur Verfügung gestellt. Durch eine Dichtefraktionierung können in Böden und Sedimenten gering zersetzte organische Substanz und organo-mineralische Komplexe von der Mineralfraktion getrennt werden. Die Trennung erfolgt über eine Dichtefraktionierung nach unterschiedlichen Dichtebereichen. Die wichtigsten Dichtebereiche für Böden, welche für die Charakterisierung der organischen Substanz in Sedimente bisher selten eingesetzt wurden (HEDGES UND OADES 1997), sind nach SHAYMUKHAMETOV ET AL (1985) und CHRISTENSEN (1992):

leichte Fraktion (<2,0 g cm⁻³): Diese Fraktion setzt sich aus gering zersetzter organischer Substanz in freier partikulärer Form zusammen.

mittlere Fraktion (2,0-2,4 g cm⁻³): Diese Fraktion enthält organo-mineralische Komplexe.

schwere Fraktion (>2,4 g cm⁻³): Diese Fraktion ist praktisch frei von organischer Substanz.

Die drei gewonnenen Dichtefraktionen zeigten eine deutlich unterschiedliche Färbung. Die schwere Fraktion mit einer Dichte von > 2,4 g/cm³ hatte eine rötlichbraune Farbe, die durch die mehrheitlich vorhandenen Eisenhydroxide zustande kam. Die mittlere Fraktion (2,0-2,4 g/cm³) zeigte eine olive-beige Verfärbung, während die leichte Fraktion (< 2,0 g/cm³) aus einem homogenen schwarz-braunen schluffigen Ton bestand.

Die leichte, mittlere und schwere Dichtefraktion aus H1₇₇ und H3₇₇ wurde als Substrat für die mikrobielle Fe(III)-Reduktion verwendet. Die durchgeführten Versuche wurden aus einer

Vorkultur (MB_{HZIII} ; siehe 3.14) 10%ig angeimpft, die anoxisch mit 40 mM Schwertmannit_{sterilf.} bei pH 5,5 und einer Huminstoff-Lösung aus Zone III angezogen wurde.

Über eine Versuchszeitspanne von 57 Tagen konnte im Vergleich zu den nicht inokulierten Kontrollansätzen eine Zunahme in der $Fe(II)_{ges.}$ -Konzentration festgestellt werden. Am deutlichsten fiel diese Stimulierung bei der Verwendung der leichten Fraktion aus H1₇₇ und H3₇₇ aus. Hier konnte eine Zunahme der $Fe(II)$ -Konzentration um ca. 6 mM gemessen werden (Tabelle 3.9). In den entsprechenden Kontrollansätzen lag die Zunahme in der $Fe(II)$ -Konzentration bei 0,8 mM für H3₇₇-L_F und 0,5 mM für H1₇₇-L_F.

Für die mittlere Dichtefraktion aus Restsee 77 ließ sich eine Tendenz in der $Fe(II)$ -Bildung erkennen. Für die inokulierten Ansätze mit den Dichtefractionen H3₇₇-M_F konnte eine Zunahme in der $Fe(II)$ -Konzentration von 0,88-1,07 mM gemessen werden. In den entsprechenden Kontrollansätzen lag die $Fe(II)$ -Zunahme bei 0,04-0,26 mM.

Tabelle 3.9 Verwendung der Kohlenstofffraktionen aus Restsee 77 und 116.

Dichtefraktion	$Fe(II)_{ges.}$ -Konzentration [mM]			
	t_0	t_{14}	t_{35}	t_{57}
Restsee 77				
inokuliert				
H1 ₇₇ -L _F	0,71	0,59	3,41	6,74
H1 ₇₇ -M _F	0,37	0,33	0,62	0,36
H1 ₇₇ -S _F	0,40	0,50	0,74	0,54
H3 ₇₇ -L _F	0,44	0,44	4,02	6,74
H3 ₇₇ -M _F	0,34	0,48	0,92	1,41
H3 ₇₇ -S _F	0,97	0,35	0,48	0,42
Kontrolle				
H1 ₇₇ -L _F ^{c)}	0,57	0,65	0,34	1,06
H1 ₇₇ -M _F ^{b)}	0,22	0,33	0,03	0,22
H1 ₇₇ -S _F ^{a)}	0,22	0,25	0,04	0,22
H3 ₇₇ -L _F	0,32	0,50	0,14	1,18
H3 ₇₇ -M _F	0,22	0,23	0,02	0,28
H3 ₇₇ -S _F	0,09	0,49	0,00	0,06

^{a)} SF = schwere Fraktion; ^{b)} MF = mittlere Fraktion; ^{c)} LF = leichte Fraktion.

Hypothese IV: Es kommt im Sediment zu einer an die Fe(III)-Reduktion gekoppelten mikrobiellen S-Oxidation.

Die postulierte Kopplung der Schwefeloxidation (PEINE ET AL. 1999) an die Fe(III)-Reduktion sollte in Mikrokosmenversuche sowie an Anreicherungs- und/oder Reinkulturen untersucht werden. Für die Gewinnung von Anreicherungs- und/oder Reinkulturen, die diesen Prozess betreiben, musste zuerst die chemische Reaktion von Sulfid mit Fe(III) unter sauren pH-Werten untersucht werden, wobei die hierbei gebildeten Reaktionsprodukte als Substrat für die Anreicherungskulturen sowie die Mikrokosmenversuche eingesetzt werden sollten. Die Daten zur chemischen Reaktion von Sulfid unter sauren pH-Bedingungen mit Fe(III) sollte das geochemische Teilprojekt liefern. Da jedoch ein stabiler Betrieb des in diesem Teilprojekt entwickelten chemischen Reaktors erst sehr spät möglich war, wurden zusätzlich Vorversuche in Form von Batch-Versuchen durchgeführt.

Zusätzlich wurde in Mikrokosmen der Zone III die Sulfatreduktion durch Zugabe von Acetat stimuliert. In diesen Ansätzen wurde der Verlauf der Sulfatreduktion sowie die Bildung der reduzierten Schwefelverbindungen verfolgt.

3.16 Chemische Umsetzung von zugegebenem Na₂S zu Sedimentproben und Eisenfestphasen

Die Untersuchungen zur chemischen Umsetzung von Na₂S an unterschiedlichen Fe-Quellen ergaben eine hauptsächliche Umsetzung nach 1 h zu elementarem Schwefel bei einer gleichzeitigen Bildung von Fe(II). Mit Sedimentmaterial aus Zone I und Zone III wurden 50-52% des zugesetzten Sulfids zu elementarem Schwefel oxidiert. Tendenziell wurde unter sauren pH-Bedingungen (pH 3) weniger S⁰ gebildet als unter neutraleren pH-Werten (pH 5). Für eine vollständige Oxidation des Sulfidschwefels zu Sulfat konnten keine Hinweise gefunden werden (Tabelle 3.10).

Die Zugabe von Na₂S (2,5 mM) zu Sedimentmaterial aus Zone I und Zone III führte zu einem Anstieg in der Fe(II)_{ges.}-Konzentration. In Zone I betrug der Anstieg 0,96 mM; in Zone III fiel der Anstieg mit 2,59 mM deutlich höher aus. Das zugesetzte Sulfid wurde in beiden Zonen überwiegend in Form von elementarem Schwefel wiedergefunden. So lag in Zone I mit 1,3 mM S⁰ die Wiederfindung bei 52%, in Zone III betrug sie mit 1,25 mM 50%. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Verwendung von Schwertmannit sowie den löslichen Fe(III)-Formen FePP_i und FeCitrat erzielt. Bei Schwertmannit (pH 3) kam es zu

einem Anstieg in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 1,64 mM. Etwas höher war der Anstieg bei pH 5 mit 1,94 mM. Nach 1 h konnte elementarer Schwefel mit 0,87 mM bzw. 1,10 mM bestimmt werden, was einer Wiederfindung von 34% bei pH 3 bzw. 44% bei pH 5 entsprach. Insgesamt zeigt der Vergleich der prozentualen Wiederfindung des Sulfidschwefels in Form von elementarem Schwefel dass unter sauren pH-Bedingungen weniger Sulfid zu S^0 oxidiert wird. Diese Tendenz wird auch bei der Betrachtung der Ergebnisse mit den löslichen Fe(III) -Quellen deutlich. So lag beim verwendeten FePP_i die Bildung von S^0 unter pH 5-Bedingungen um den Faktor 2,8 höher als im Vergleich zu pH 3. Beim FeCitrat betrug dieser Faktor 1,8. Für die Oxidation des Sulfidschwefels an Fe(III) zu S^0 sprechen auch die berechneten Wiederfindungsraten der bei dieser Oxidation übertragenen Elektronen auf Fe(III) . Außer in Zone I lag in allen Ansätzen die Elektronenwiederfindung bei 88-111%.

Da zum Zeitpunkt des Versuchs die Methode zur Messung von TRIS und AVS im Aufbau, und daher die Anzahl der möglichen Messungen limitiert war, konnte die Bestimmung dieser Verbindungsgruppe nur in einigen Ansätzen erfolgen. In den Zone I-Ansätzen wurde eine Zunahme im TRIS um 0,93 mM, und im S^0 um 1,3 mM ermittelt. Hier wurde nicht der ganze S^0 mittels Cr^{2+} -Ausschluss erfasst. Im Gegensatz hierzu, wurde in den Zone III-Ansätzen eine Zunahme im TRIS um 3 mM bei einer Zunahme im S^0 von 1,25 mM bestimmt.

Dies lässt darauf schließen, dass neben S^0 noch weitere Verbindungen wie z.B. Pyrit gebildet wurden. Da aber AVS nicht bestimmt werden konnte, war die Berechnung einer möglichen Pyrit-Bildung nicht möglich. Im Schwertmannit_{sterilf.}-Ansatz bei pH 5 wurde eine TRIS-Zunahme von 0,2 mM gemessen. Dieser Wert ist wahrscheinlich zu niedrig bestimmt, da beim Messvorgang der Butyl-Stopfen nicht dicht abschloss und ein Entweichen des sich entwickelnden Sulfids bei der Cr^{2+} -Reduktion aus den Serumflaschen erfolgte.

Für eine Oxidation des zugesetzten Na_2S zu Sulfat konnten keine Hinweise gefunden werden. Es konnte nur in Zone I durch die Zugabe von Sulfid eine Zunahme in der Sulfatkonzentration um 0,66 mM beobachtet werden. In Zone III kam es hingegen zu einer geringen Abnahme. Die Zunahme in der Sulfatkonzentration in Zone I lässt sich allerdings dadurch erklären, dass es durch die chemische reduktive Auflösung des in Zone I dominierenden Fe-Minerals Schwertmannit_{sterilf.}, es zur Freisetzung des im Schwertmannit eingelagerten Sulfats kommt. Dafür spricht der Befund, dass in Zone III keine Zunahme in der Sulfatkonzentration beobachtet wurde. In dieser Zone ist der größte Teil des Schwertmannits bereits durch Alterungsprozesse in Goethit transformiert worden.

Tabelle 3.10 Umsatz von Na₂S an unterschiedlichen Fe(III)-Formen bei pH 3 und pH 5

Fe(III)-Quelle	Vor der Zugabe von Na ₂ S ^{a)}						1h nach Zugabe von Na ₂ S						Wieder- findung	
	Sulfat [mM]	pH	Fe(II) [mM]	TRIS [mM]	S ²⁻ [mM]	S ⁰ [mM]	Sulfat [mM]	pH	Fe(II) [mM]	TRIS [mM]	S ²⁻ [mM]	S ⁰ [mM]	S ⁰ [%]	e ⁻ [%]
Feste Fe(III)-Quelle														
Schwertmannit_{sterilf.}														
pH3	5,45	2,97	0,21	n.b.	0,00	0,00	4,66	4,30	1,85	n.b.	1,45	0,87	35	94
Schwertmannit_{sterilf.}														
pH5	6,12	5,01	0,13	0,00	0,00	0,00	4,19	5,67	2,07	0,2 ^{b)}	0,98	1,10	44	88
Sediment: Zone I	8,39	2,87	24,73	0,00	0,00	0,00	9,05	2,92	25,69	0,93	0,00	1,30	52	37
Sediment: Zone III	9,02	5,64	59,76	2,88	0,00	0,00	8,96	5,71	62,35	5,83	0,87	1,25	50	104
Lösliche Fe(III)-Quelle														
FePP_i pH 3	5,67	3,1	0,64	n.b.	n.b.	0,00	5,34	3,8	3,07	n.b.	0,00	1,15	23	106
FePP_i pH 5	5,73	5,0	0,89	n.b.	n.b.	0,00	5,98	5,2	6,89	n.b.	0,00	3,15	63	95
FeCitrat pH 3	6,12	3,0	1,1	n.b.	n.b.	0,00	6,22	3,2	5,61	n.b.	0,00	2,03	41	111
FeCitrat pH 5	5,61	5,1	0,94	n.b.	n.b.	0,00	5,46	5,3	9,21	n.b.	0,00	3,75	75	110

n.b. nicht bestimmt; ^{a)} Bei der Verwendung von Sedimentmaterial und Schwertmannit wurde Na₂S in einer Endkonzentration von 2,5 mM zugesetzt. Bei den löslichen Fe-Quellen wurde Na₂S in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt. ^{b)} undichter Butyl-Stopfen

In den Ansätzen mit Schwertmannit kam es zu Abnahmen in der Sulfatkonzentration um 0,79 mM bei pH 3 und 1,93 mM bei pH 5. In den Ansätzen mit FePP_i und FeCitrat wurden geringe Veränderungen in der Sulfatkonzentration (0,10-0,33 mM) gemessen. Es kam hierbei sowohl zu einer Zunahme (siehe FePP_i bei pH 5 und FeCitrat bei pH 3) als auch zu einer Abnahme in der Sulfatkonzentration (z.B. FePP_i bei pH 5). Da es sich hierbei um Einzelmessungen handelt, kann es sich bei diesen Änderungen in der Konzentration um Messschwankungen handeln.

3.17 Zeitlicher Verlauf der Fe- und S-Spezies während einer stimulierten Sulfatreduktion mit Acetat in Zone III

Durch Zugabe von Acetat (5 mM) zu Mikrokosmen aus der Zone III konnte die Sulfatreduktion stimuliert werden, wobei ein Teil des bei der Sulfatreduktion gebildeten Sulfids im Versuchsverlauf als elementarer Schwefel gemessen wurde. In den stimulierten Versuchsansätzen kam es nach einer Verzögerungsphase von 20 Tagen, in der die Konzentrationen für Sulfat, $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ relativ konstant blieben, zu einer Abnahme in den Konzentrationen für Sulfat und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$. Zeitgleich nahm die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration zu (Abbildung 3.20). Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung verlief ab diesem Zeitpunkt linear mit einer Rate von $646 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Nach einer Zeitspanne von 60 Tagen (t_{60}) kam es zu einer Verringerung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates und es stellte sich zum Versuchsende hin ein Plateau bei ca. 125 mM $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ ein. Zeitgleich mit der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung kam es zu einer Abnahme in der Sulfatkonzentration von 5,03 mM auf 0,98 mM und in der $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ -Konzentration von 2,52 auf 0,16 mM. Sulfat und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ stieg zum Versuchsende wieder an. Mit der Abnahme an Sulfat und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ konnte eine Zunahme der gemessenen AVS-, TRIS- und S^0 -Konzentrationen beobachtet werden. Von dem ca. 4 mM verbrauchten Sulfat zum Zeitpunkt t_{60} konnten 13% in Form von elementarem Schwefel (0,53 mM) wiedergefunden werden. Während dieser Zeitspanne stieg der Wert für AVS von 0,6 auf 2,98 mM und für TRIS von 0,25 auf 2,91 mM. Wie schon in den Batch-Versuchen (siehe 3.16) beschrieben, konnte auch durch die Stimulierung der Sulfatreduktion in Mikrokosmen aus Zone III eine Bildung von elementarem Schwefel als Reaktionsprodukt aus der chemischen Reaktion von Sulfid mit Fe(III) -Mineralen unter sauren pH-Werten nachgewiesen werden. Zwar konnte kein freies Sulfid als Endprodukt der Sulfatreduktion gemessen werden. Dass jedoch eine Sulfatreduktion in den Mikrokosmen ablief, kann indirekt aus der Abnahme an Sulfat sowie an der Abnahme von $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ geschlossen werden. Das gebildete Sulfid reagiert mit dem $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$, wobei neben elementarem Schwefel Eisensulfide entstehen, die unter AVS oder TRIS erfasst wurden.

Die Zunahme von TRIS um $\Delta 2,66$ mM lässt sich vollständig durch die Zunahme an elementarem Schwefel ($\Delta 0,5$ mM) und AVS ($\Delta 2,38$ mM) erklären. Die hieraus erfolgte Berechnung der Pyritbildung ($\text{Pyrit} = \text{TRIS} - \text{AVS} - \text{S}^0$) ergab einen negativen Wert von $-0,25$ mM. Da jedoch die Standardabweichungen von TRIS, AVS und elementarem Schwefel mit $\pm 0,44$, $\pm 0,83$ und $\pm 0,29$ mM den Wert für Pyrit von $-0,25$ mM überstiegen, liegt der berechnete negative Wert für die Pyritbildung im Bereich der Messwertschwankungen. Eine nennenswerte Pyritbildung bei der Sulfatreduktion unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte daher ausgeschlossen werden.

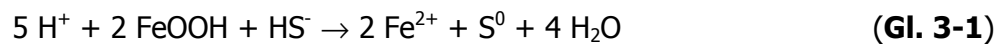
Tabelle 3.11 Konzentrationen der unterschiedlichen Schwefelverbindungen in den Acetat stimulierten Ansätzen und in den Kontrollansätzen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten.

	Zeitpunkt [Tage]		
	t_0	t_{60}	t_{130}
Mit 5 mM Acetat			
TRIS [mM]	0,25 ($\pm 0,26$)	2,91 ($\pm 0,44$)	1,62 ($\pm 0,77$)
AVS [mM]	0,60 ($\pm 0,24$)	2,98 ($\pm 0,83$)	1,38 ($\pm 0,58$)
S⁰ [mM]	0,03 ($\pm 0,02$)	0,53 ($\pm 0,29$)	0,05 ($\pm 0,05$)
Sulfat [mM]	5,03 ($\pm 0,71$)	0,98 ($\pm 0,23$)	2,33 ($\pm 0,54$)
Acetat [mM]	4,88 ($\pm 0,43$)	0,31 ($\pm 0,02$)	0,00 ($\pm 0,00$)
Kontrollansätze			
TRIS [mM]	0,21 ($\pm 0,19$)	0,19 ($\pm 0,15$)	0,22 ($\pm 0,17$)
AVS [mM]	0,24 ($\pm 0,15$)	0,17 ($\pm 0,12$)	0,20 ($\pm 0,16$)
S⁰ [mM]	0,01 ($\pm 0,01$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,02 ($\pm 0,01$)
Sulfat [mM]	4,88 ($\pm 0,43$)	4,45 ($\pm 0,34$)	4,14 ($\pm 0,26$)
Acetat [mM]	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)

Mit dem erneuten Anstieg in der Sulfat- und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ -Konzentrationen zum Versuchsende hin erfolgte eine Abnahme im TRIS auf 1,62 mM, im AVS auf 1,38 mM und im elementaren Schwefel auf 0,05 mM. Da zum Zeitpunkt t_{90} der Sulfatzunahme keine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung mehr erfolgte, kann eine Freisetzung von Sulfat durch eine reduktive Auflösung von Schwertmannit, wie bereits unter Punkt 3.16 beschrieben, ausgeschlossen werden. Dieser Anstieg in der Sulfatkonzentration, der parallel mit dem Anstieg der $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ -Konzentration erfolgt, lässt den Schluss zu, dass die gebildeten Eisensulfide einer Oxidation unterliegen, bei

der der enthaltene Schwefel zu Sulfat oxidiert wird. In den Kontrollansätzen ohne zugesetztes Acetat konnte weder in den Sulfat- und $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ -Konzentration noch bei TRIS, AVS und elementarem Schwefel eine Änderung beobachtet werden (Tabelle 3.11). Die Freisetzung von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ verlief parallel zu den mit Acetat stimulierten Ansätzen.

Die erhaltenen Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass elementarer Schwefel als Hauptprodukt der chemischen Reaktion von Sulfid mit Fe(III) unter sauren Bedingungen angesehen werden kann. Bestätigt wird dies durch Ergebnisse aus dem geochemischen Teilprojekt, in dem mittels Reaktorversuchen eine stöchiometrische Oxidation von Sulfid ($120 \mu\text{mol/l}$) zu elementarem Schwefel und eine Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) an den untersuchten Fe(III) -Mineralen Goethit, Hämatit und Ferrihydrit beobachtet werden konnte (GADE 2003). Die Reaktionsgleichung der Sulfidoxidation durch Goethit wurde wie folgt beschrieben:



Die Reaktionen verliefen stark pH-abhängig, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkendem pH-Wert abnahm. Die Reaktionskonstanten waren jedoch nicht wie vermutet von der spezifischen Oberflächen der Fe(III) -Hydroxide abhängig. Es konnte vielmehr eine Abhängigkeit von der Oberflächenazidität festgestellt werden, wobei die stärker kristallinen Eisenhydroxide schneller mit Sulfid reagierten als die schwachkristallinen. So zeigten die Reaktionsversuche von Sulfid mit Schwertmannit die geringsten Reaktionsraten (GADE 2003). Als ein entscheidender Faktor für die Reaktionskinetik wird die Dichte und Anordnung der oberflächenständigen OH-Gruppen auf den Eisenhydroxide angesehen. Mit zunehmender Kristallinität steigt die Dichte dieser reaktiven oberflächenständigen OH-Gruppen, welche eine erhöhte Reaktionsrate ermöglichen (STUMM UND MORGAN 1996). Die pH-Abhängigkeit beruht darauf, dass jede dieser reaktiven OH-Gruppen einer Protonierung mit ihrer eigenen Reaktionskonstanten k unterliegt (HIEMSTRA ET AL. 1989).

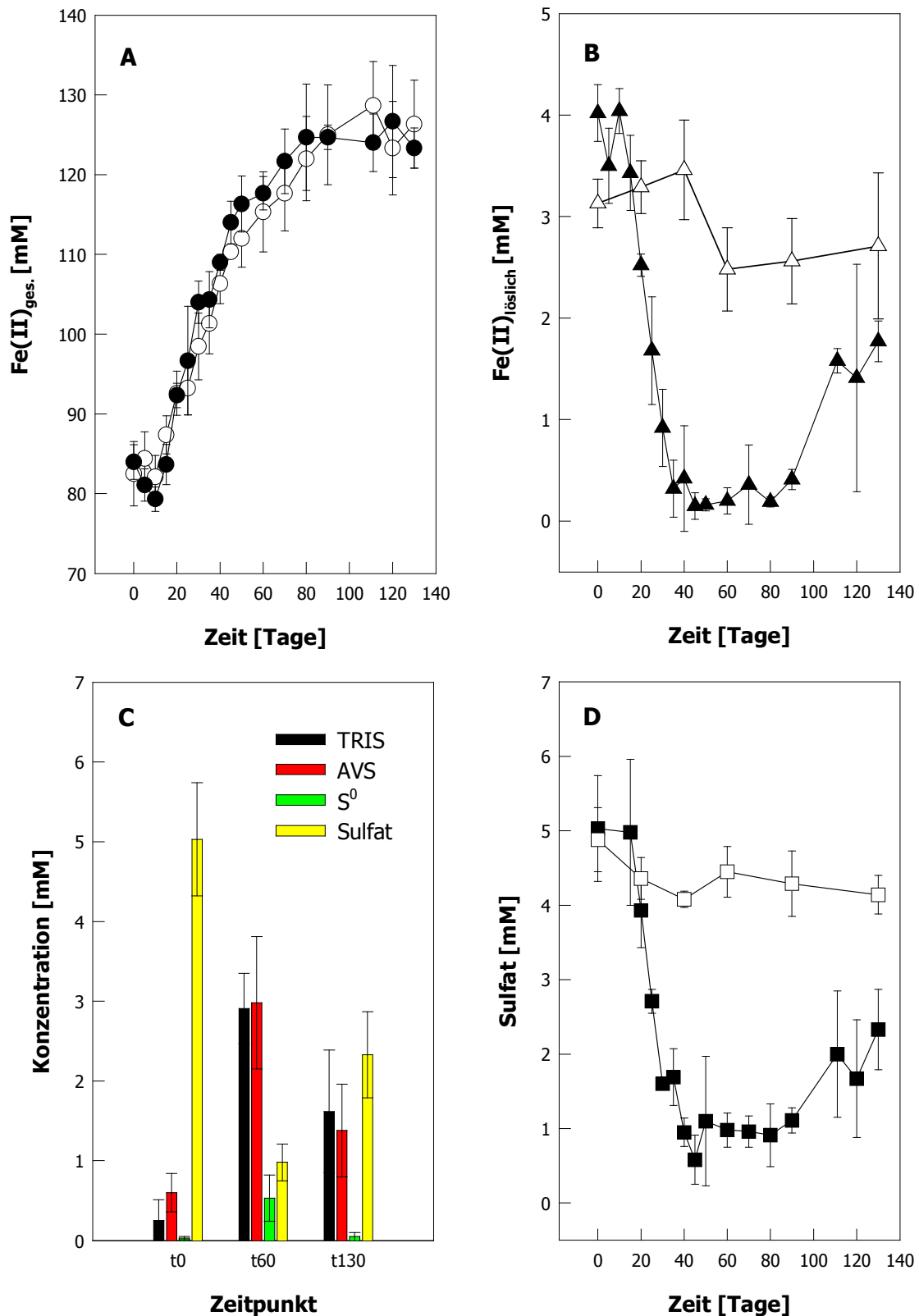


Abbildung 3.20 Zeitlicher Verlauf von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ (A), $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ (B), S-Verbindungen (C) und Sulfat (D) während der Sulfatreduktion mit 5 mM Acetat als Elektronendonator in Zone III. Die dargestellten Messwerte sind der Mittelwert aus drei Parallelansätzen mit den Standardabweichungen. Die ausgefüllten Symbole sind die Messwerte aus den Mikrokosmen mit zugesetztem Acetat. Die unterschiedlichen Schwefel-Pools im stimulierten Ansatz sind in (c) dargestellt.

3.18 Effekt von elementarem Schwefel auf die Reduktion von Fe(III) in Zone I und Zone III

Durch die Zugabe von 10 mM elementarem Schwefel (S^0_{flowable}) zu Mikrokosmen aus der Zone I konnte eine Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration blieb während der ersten zwei Versuchstage relativ konstant. Während dieser Zeit kam es zu einer geringen Zunahme von 0,47 mM. Ab diesem Zeitpunkt stieg die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration mit einer Rate von $886 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und zum Versuchsende lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration bei 18,5 mM. In der Kontrolle ohne Zugabe von Schwefel setzte die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung ebenfalls erst nach zwei Tagen ein. In den ersten zwei Tagen stieg die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 0,4 mM von 5,0 auf 5,4 mM an. Danach stellte sich eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates von $290 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ ein. Bei Versuchsende lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration bei 10,9 mM. Insgesamt verlief die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Kontrollen und in den mit Schwefel versetzten Ansätzen in den ersten 6 Tagen nahezu parallel. Erst nach 10 Tagen konnte zwischen den zwei Ansätzen ein Unterschied gemessen werden. Parallel zur Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration stieg die Sulfatkonzentration. In der Kontrolle kam es zu einer Zunahme um 1,4 mM von 4,7 auf 6,1 mM, in den mit Schwefel inkubierten Mikrokosmen um 7,2 mM von 4,7 auf 11,9 mM.

Würde diese Sulfatzunahme um 7,2 mM gänzlich aus einer an die Fe(III)-Reduktion gekoppelten Oxidation des elementaren Schwefels zu Sulfat erfolgen, würde dies eine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 43,3 mM bedeuten. Während der Versuchszeitspanne kam es in Zone I mit Schwefel zu einer Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 13,7 mM, was einer Oxidation von ca. 2,3 mM S^0 zu Sulfat entspräche. Somit müssten die restlichen 4,9 mM Sulfat aus der reduktiven Auflösung des Schwertmannits stammen.

Mit der Zugabe von elementarem Schwefel zu den Zone III-Mikrokosmen konnte Aufgrund der zu großen Standardabweichungen keine signifikante Stimulierung in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung beobachtet werden. In diesen Versuchsansätzen stieg die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration in den ersten 10 Tagen von 30 mM auf 60 mM und blieb dann bis zum Versuchsende nahezu konstant. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Kontroll-Mikrokosmen verlief parallel. Aufgrund der starken Messschwankungen konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsansatz beobachtet werden. Auch ein Vergleich der Sulfatkonzentrationen ergab keinen Hinweis auf eine Schwefeloxidation, da die Sulfatwerte über die gesamte Versuchszeitspanne relativ konstant blieben.

Mit Sulfid (5 mM), Thiosulfat (10 mM) und Tetrathionat (20 mM) konnte in keiner Zone eine Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung erzielt werden (Abbildung 6.2).

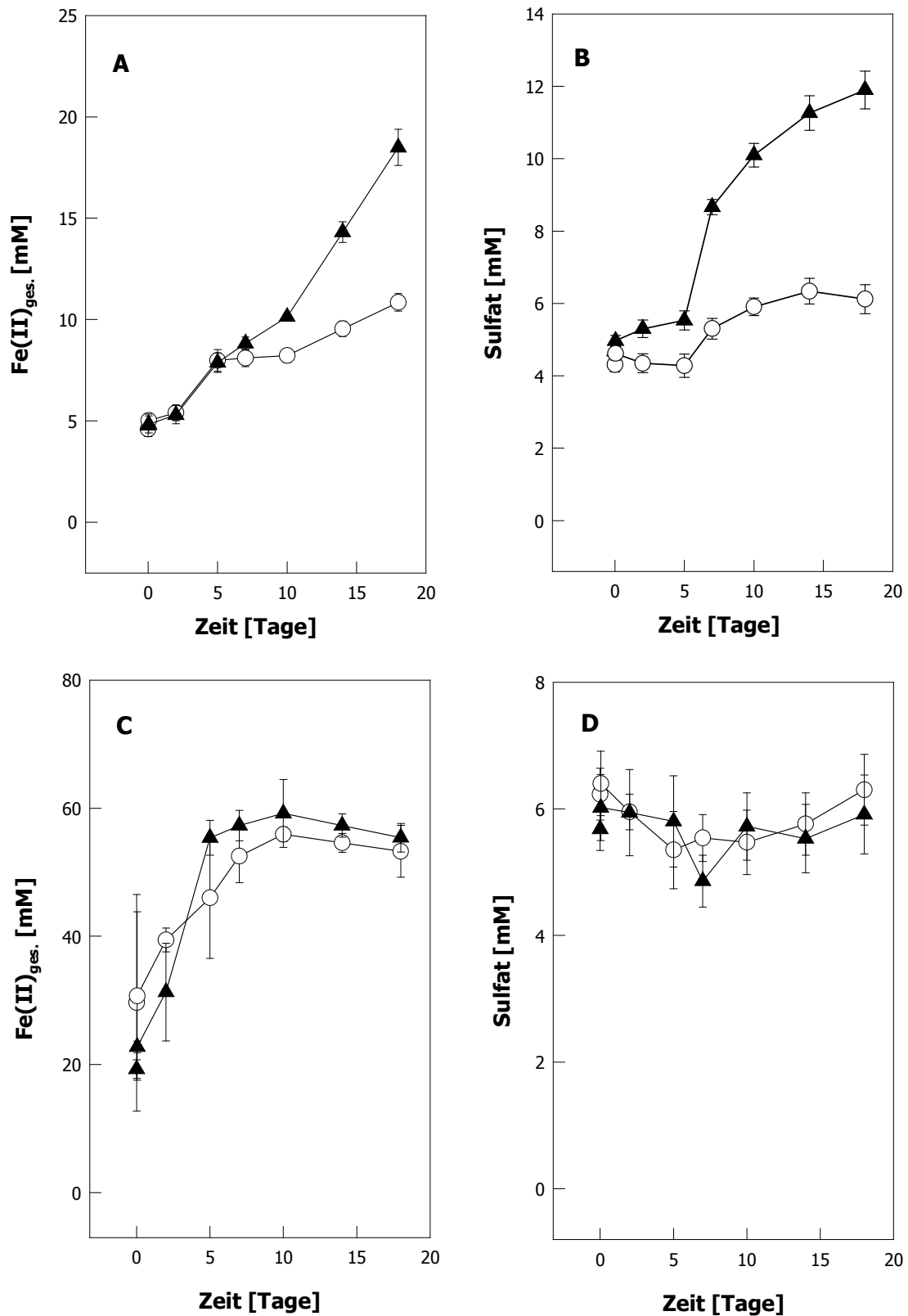


Abbildung 3.21 Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung durch elementaren Schwefel (10 mM). Dargestellt ist der Verlauf von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ (**A**: Zone I; **C**: Zone III) und Sulfat (**B**: Zone I; **D**: Zone III). Die ausgefüllten Symbole stellen die mit elementarem Schwefel stimulierten Ansätze dar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Parallelmessungen mit den Standardabweichungen.

3.19 Anreicherungskultur MB1 und MB2 mit Sulfid (5 mM) und Schwertmannit_{autokl.} (40 mM) bei pH 3 und pH 5

Zu Beginn dieser Arbeit wurden mit MB1 und MB2 zwei Anreicherungskulturen übernommen, die im Rahmen einer Diplomarbeit (ROTH 2000) im November 1999 angesetzt wurden. Beide Anreicherungskulturen wurden über einen MPN-Ansatz aus der Zone III angelegt. MB1 wurde hierbei aus einer 10^{-2} -, MB2 aus einer 10^{-3} -Verdünnungsstufe angesetzt. In den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 konnte sowohl bei pH 3 als auch bei pH 5 eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über eine Versuchszeitspanne von 479 Tagen beobachtet werden. Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung bei pH 3 erfolgte in den ersten 225 Tagen in den Anreicherungskulturen mit einer Rate von $2 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ für MB1 und $1,6 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ für MB2. Diese Rate stieg im Verlauf des Versuchs auf $45 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ für MB1 und $19,5 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ für MB2 an. Der pH lag bei Versuchsende bei 6,2 bzw. 6,4. In den inokulierten Kontrollansätzen ohne Na_2S , konnte während des Versuchsverlaufs eine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 0,57 (für MB1) bzw. 0,71 mM (für MB2) bestimmt werden.

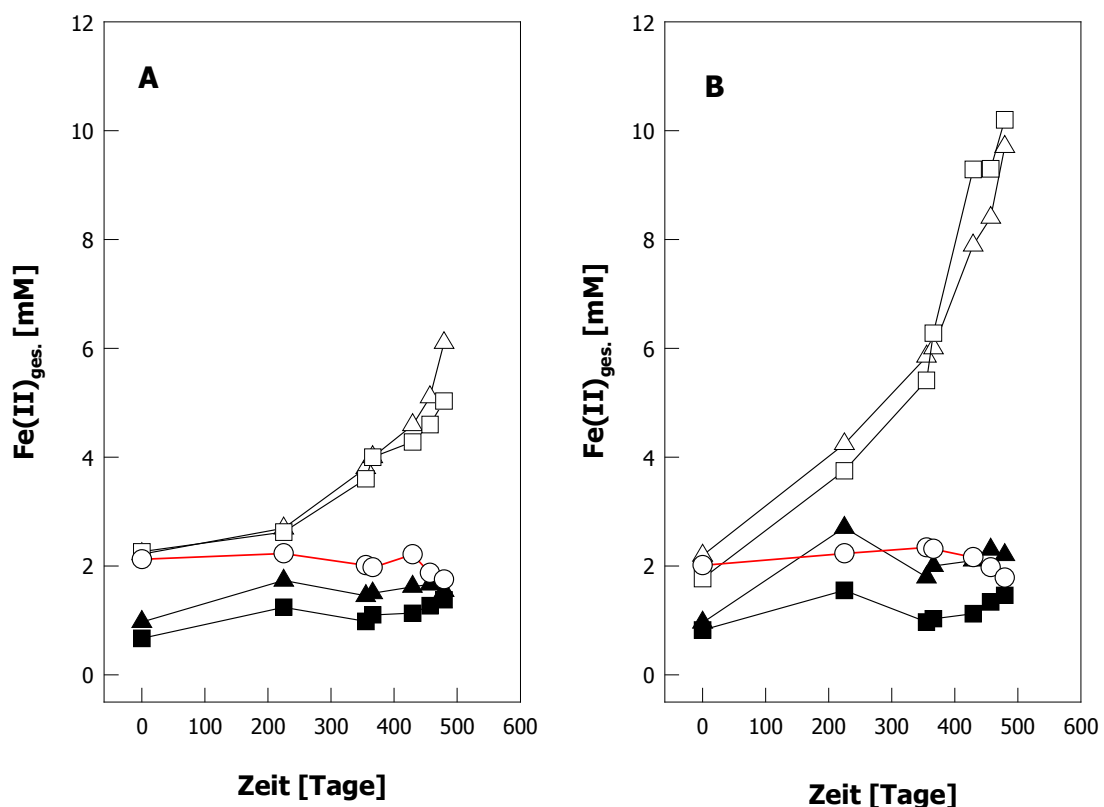


Abbildung 3.22 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Schwertmannit (40 mM) in den Anreicherungskulturen MB1 (\triangle) und MB2 (\square) in Mineralmedium mit Na_2S (5 mM) als Elektronendonator bei 20°C und bei pH 3 (**A**) und pH 5 (**B**). Die ausgefüllten Symbole stellen die Ansätze mit Inokulum, aber ohne Na_2S dar; chemische Kontrolle (\circ) Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelwerte.

Die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration in den nicht inokulierten chemischen Kontrollen (Medium mit 40 mM Fe(OH)_3 und 5 mM Na_2S) lag zu Versuchsbeginn bei 2,12 mM und sank zu Versuchsende auf 1,75 mM ab.

Höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten in den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 konnten bei pH 5 ermittelt werden. Bei diesem pH lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates in den ersten 225 Tagen für MB1 bei $9,1 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und für MB2 bei $8,8 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Im weiteren Versuchsverlauf kam es zu einer Erhöhung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten. Diese lagen bei Versuchsende für MB1 bei $59 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und für MB2 bei $40,9 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Bei Versuchsende lag der pH in diesen Ansätzen bei 6,1 bzw. 6,7. In den pH 5-Kontrollansätzen konnte wie schon bei pH 3 nur eine geringe Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration von 1,24 (für MB1) bzw. 0,64 mM (für MB2) gemessen werden. In der chemischen Kontrolle konnte keine Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration beobachtet werden. Für die in den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 bei den gewählten pH-Werten beobachtete $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung konnte somit eine rein chemische bzw. eine aus zellulären Reservestoffen vermittelte Fe(III) -Reduktion ausgeschlossen werden.

3.19.1 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates in den Folgetransfers von MB1 und MB2 mit Na_2S

In den Folgetransfers der Anreicherungskulturen MB1 und MB2 mit Na_2S (5 mM) konnte eine Zunahme in den $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten sowohl bei pH 3 als auch bei pH 5 beobachtet werden (Tabelle 3.12, Abbildung 6.3). Sowohl bei der Originalanreicherung als auch bei den Folgetransfers konnte ein Anstieg im pH zum Versuchsende hin beobachtet werden. Ebenso stieg der pH in den Folgetransfers unmittelbar nach der Zugabe von Na_2S . Bei den Ansätzen mit pH 5 kam es nach der Zugabe von Na_2S zu einer pH-Erhöhung um 0,3 bis 0,6. Da hier der pH trotz des Anstiegs noch in dem für Zone III gemessenen pH-Spektrum von 4,9-5,6 lag (Tabelle 3.1), wurde dies als nicht weiter relevant erachtet.

Bei den pH 3-Ansätzen fiel der pH-Sprung mit 1,1 bis 1,5 pH-Einheiten deutlich größer aus und überstieg die in Zone I gemessenen pH-Werte (2,7-3,2). Um diesen Sprung im pH-Wert zu umgehen, wurden neben Na_2S auch Thiosulfat (10 mM), Tetrathionat (20 mM) und Sulfit (3 mM) als Elektronendonoren verwendet. Allerdings konnte nur mit Thiosulfat eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung in den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 erzielt werden (siehe 3.20).

Tabelle 3.12 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten in der Originalanreicherung und den Folgetransfers durch MB1 und MB2 bei unterschiedlichen pH-Werten mit Na_2S aus Schwertmannit_{sterilf.}

$\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$-Freisetzungsraten [$\mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$] und pH-Wert zu den Zeitpunkten t_0 und t_E										
	Original-anreicherung		1. Transfer		2. Transfer		3. Transfer		4. Transfer	
	FR^{a)}	pH^{b)}	FR	pH	FR	pH	FR	pH	FR	pH
MB1/pH 3	45,0	n.B. ^{c)} /6,2	54,4	4,2/6,3	42,4	4,1/6,5	56,7	4,5/6,7	66,1	4,3/n.B.
MB2/pH 3	19,5	n.B./6,4	47,1	n.B.	41,2	4,4/6,4	51,3	n.B.	61,3	4,1/6,6
MB1/pH 5	59,0	n.B./6,1	54,4	5,6/6,6	45,6	5,6/6,8	59,8	5,6/6,7	61,3	5,5/6,9
MB2/pH 5	40,9	n.B./6,7	47,08	5,4/6,7	47,3	5,3/6,1	51,6	n.B.	66,1	5,6/6,8

^{a)} $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten; ^{b)} pH bei t_0/t_E ; ^{c)} nicht bestimmt

Ein weiterer methodischer Ansatz, die Verschiebung im pH durch die Zugabe von Na_2S zu verhindern bzw. zu minimieren, bestand in der Verwendung von gepufferten Medien. Zu diesem Zweck wurde mit den FePP_i - und FeCitrat -Medien gearbeitet (Abbildung 3.23). Bei diesen Medien kam es durch den Anteil an pH-puffernden Verbindungen zu einer deutlich geringeren pH-Verschiebung (siehe hierzu auch die pH-Werte vor und nach der Zugabe von Na_2S in Tabelle 3.10). Unmittelbar nach der Zugabe von Na_2S zu FePP_i - und FeCitrat -Medien kam es zur Bildung eines schwarzen Niederschlags, der jedoch in allen pH 3-Ansätzen innerhalb von ca. 30 min. verschwand. Bei den pH 5-Ansätzen verschwand dieser Niederschlag ebenfalls; jedoch erst nach ein bis zwei Tagen.

Im Vergleich zu den Anreicherungsversuchen mit festen Fe-Quellen konnten mit der Verwendung der gepufferten Medien bis auf FePP_i bei pH 3 durchweg höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Bildungsraten sowie höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentrationswerte erzielt werden. Allerdings war die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung unabhängig von der Na_2S -Zugabe, da auch in den Kontrollansätzen ohne Na_2S eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung beobachtet wurde.

Mit der Anreicherungskultur MB2 kam es im FePP_i -Medium bei pH 3 (Abbildung 3.23) nach 40 Tagen zu einer Abnahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration; diese lag zum Versuchsende sogar unter den Konzentrationswerten zu Versuchsbeginn. Dies konnte auf eine defekte Butyl-Gummidichtung zurückgeführt werden, wodurch ein Eindringen von Luftsauerstoff wahrscheinlich war. Zum Versuchsende konnte in allen Ansätzen ein schwarzer Niederschlag beobachtet werden, was als Hinweis auf eine Sulfatreduktion gewertet wurde. Dadurch, dass in den verwendeten FePP_i und FeCitrat Medien sowohl organischer Kohlenstoff (Citrat bzw. Acetat als Verunreinigung) als auch Sulfat (ca. 6 mM) vorlag, bestand immer die Möglichkeit, dass neben der gesuchten physiologischen Gruppe auch Sulfatreduzierer und zur Fe(III) -Reduktion befähigte heterotrophe Mikroorganismen angereichert wurden. Da sich auch in

allen nachfolgenden Transfers zu Versuchsende ein schwarzer Niederschlag einstellte, wurden diese Medien nicht weiter verwendet.

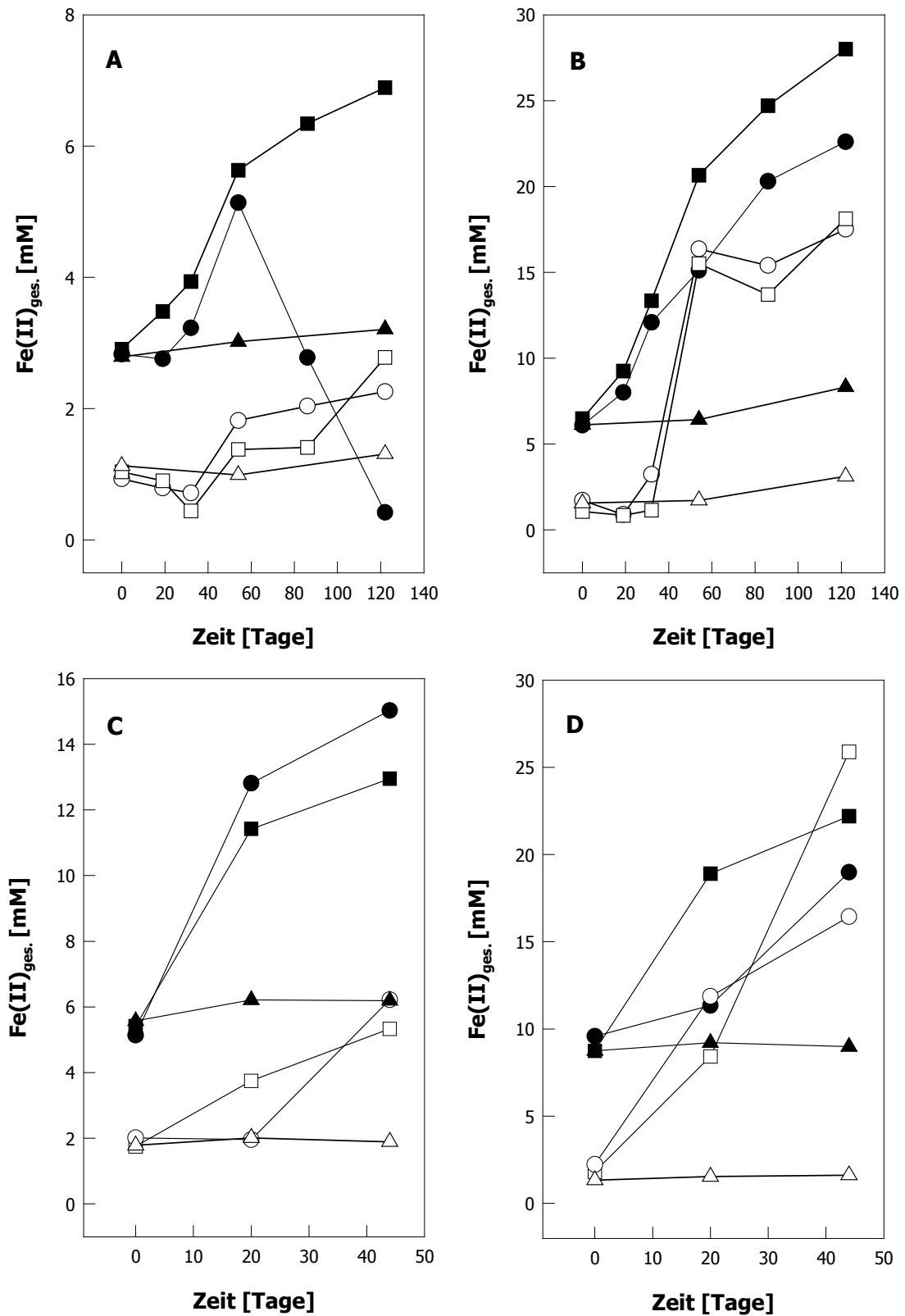


Abbildung 3.23 Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in Medien mit löslichen Fe(III)-Formen durch die Anreicherungskulturen MB1 und MB2. FePP₁-Medium bei pH3 (**A**) und pH 5 (**B**), FeCitrat-Medium bei pH 3 (**C**) und pH 5 (**D**).

3.19.2 Phylogenetische Analyse der Anreicherungskultur MB2

Aus Anreicherungskultur MB2 wurde die DNA extrahiert, mit dem Primer-Set GM3/GM4 amplifiziert und das erhaltene DNA-Produkt kloniert. Das Kloncreening erfolgte über DGGE (siehe 2.3.7). Insgesamt konnten 21 Klone erhalten werden, von denen 8 ein unterschiedliches Laufverhalten im DGGE-Gel aufwiesen. Das Insert dieser Klone wurde sequenziert. Eine Analyse der erhaltenen 16S rDNA-Gensequenzen ergab keinen Hinweis auf bekannte Fe(III)-reduzierende Bakterien. Es wurden Sequenzen aus Bakteriengruppen erhalten, die schon mit den anderen molekularbiologischen Ansätzen erfasst wurden. Es kann daher angenommen werden, dass die in den Anreicherungskulturen ablaufenden Prozesse und die enthaltenen Bakterien auch eine Relevanz für das Sediment haben.

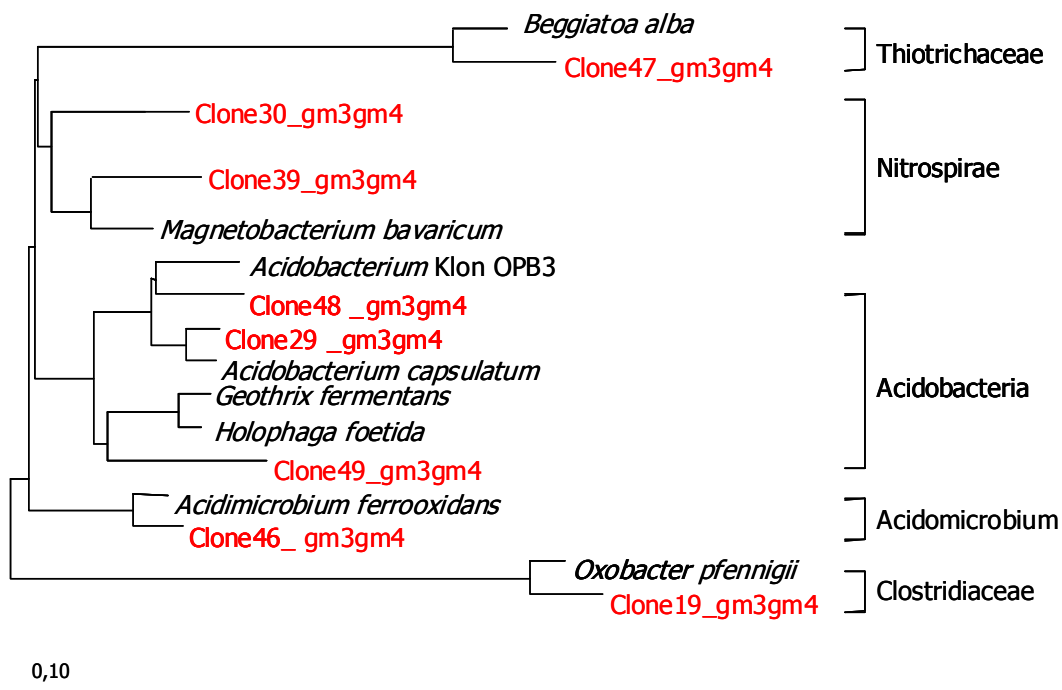


Abbildung 3.24 Phylogenetischer Baum basierend auf der 16S rDNA-Gensequenz von Stamm MB3 und den nächsten verwandten Sequenzen.

3.20 Anreicherungskultur MB1 und MB2 mit Thiosulfat (10 mM) und Fe(OH)₃ (40 mM) bei pH 5

In den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 konnte bei pH 5 eine Fe(II)_{ges.}-Freisetzung mit Thiosulfat über eine Versuchszeitspanne von 136 Tagen aus Fe(OH)₃ beobachtet werden. Die Fe(II)_{ges.}-Freisetzung setzte bei MB2 nach 60 Tagen, bei MB1 erst nach 70 Tagen ein. Die ermittelten Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsraten mit Thiosulfat waren höher als mit Na₂S. So lag die Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsraten für MB1 bei 86,9 µmol l⁻¹ d⁻¹ und für MB2 bei 103,7 µmol l⁻¹ d⁻¹. Der

pH lag zu Versuchsbeginn direkt nach der Zugabe von Thiosulfat bei 5,3 bzw. 5,1 und stieg zu Versuchsende auf einen Wert von 6,4 bzw. 6,7 an.

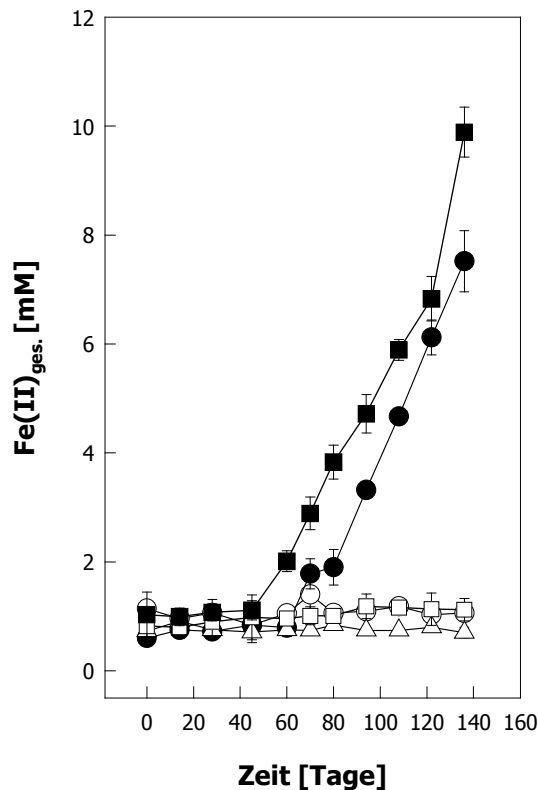


Abbildung 3.25 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Fe(OH)_3 mit 10 mM Thiosulfat bei pH 5 durch die Anreicherungskulturen MB1(●) und MB2 (■). Die offenen Symbole (○ MB1; □ MB2) stellen die Messwerte für die Kontrollansätze ohne Thiosulfat sowie den Kontrollansatz nur mit Thiosulfat (◇) dar. Dargestellt ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus zwei Parallelansätzen.

3.21 Versuch der Gewinnung von Reinkulturen aus den Anreicherungskulturen MB1 und MB2

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Reinkulturen wurde etwas Material aus den Originalanreicherungen als auch aus den 1. und 2. Transfer von MB1 und MB2 (ca. 100 µl) entnommen und auf Agar-Platten ausgestrichen (Mineralmedium, pH 5, 40 mM Schwertmannit_{autokl.}, 5 mM Na_2S , 2%-Agar). Ebenso wurden die auf Thiosulfat angezogenen Anreicherungskulturen MB1 und MB2 auf Agar-Platten mit Thiosulfat ausgestrichen.

Auf allen angeimpften Agar-Platten konnten nach einer Inkubationsdauer von 12 Monaten einige kleine Kolonien (2-12 Kolonien pro Platte; $\varnothing < 1$ mm) beobachtet werden. Eine Reduktion des Fe(III) -Minerals hätte an der Auflösung und damit an der Bildung eines Lysehofs um die Kolonien herum zu erkennen sein müssen. Keine der Kolonien wies jedoch einen Lysehof auf. Da aufgereinigter Agar noch Reste organischen Verbindungen enthält, lag

für die beobachteten Kolonien ein langsames heterotrophes Wachstum nahe. Aus den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 konnte keine Reinkultur gewonnen werden.

Um auszuschließen, dass durch das Aufbringen des Inokulums auf die Agar-Oberfläche ein notwendiger Kontakt zur Fe(III)-Festphase nicht sichergestellt wurde, erfolgte gleichzeitig eine Isolierung über eine Tiefagar-Verdünnungsreihe. Mit diesem Ansatz konnte nach ca. 10 Monaten ein Wachstum von kleinen rötlich-braunen, braunen und schwarzen Kolonien ($\varnothing < 0,5 \text{ mm}$) beobachtet werden. Jeweils 5 von diesen unterschiedlich gefärbten Kolonien wurden mittels einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agar entnommen und in Flüssigmedium (Thio-Medium, pH 5, 5 mM Na_2S und 40 mM $\text{Fe}(\text{OH})_3$) transferiert und bei 20°C inkubiert. Nach einer Inkubation von 12 Wochen wurden diese Ansätze zur $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Messung beprobt. Fünf dieser Ansätze zeigten eine zum Kontrollansatz (5 mM Na_2S ; 40 mM $\text{Fe}(\text{OH})_3$) höhere $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Freisetzung und wurden frisches Medium mit 5 mM Na_2S transferiert. Alle diese Ansätze (ME1 - ME5) zeigten nach wenigen Wochen eine Schwarzfärbung der Fe(III)-Festphase, was auf eine Bildung von Eisensulfiden zurückzuführen ist. In allen Ansätzen (ME1 - ME5) waren unter dem Mikroskop überwiegend unbewegliche, lange Stäbchen zu erkennen. Es gelang jedoch nicht, diese Ansätze kontinuierlich weiter zu führen. Die Ansätze ME1, ME2 und ME5 konnten im 2. Transfer keine Aktivität mehr festgestellt werden; ME3 und ME4 stellten mit dem 3. Transfer jede Aktivität ein.

3.22 Kopplung der Oxidation von S-Verbindungen an die Fe(III)-Reduktion in Anreicherungskultur MB2 bei pH 3 und pH 5

Anreicherungskultur MB2 zeigte unter pH 3,9 und pH 5,5 eine an die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen aus der Initialreaktion von zugesetztem Na_2S mit den im Medium enthaltenen Schwertmannit_{sterilf.}. Die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen war dabei an die Reduktion von Fe(III) gekoppelt. Hinweise auf eine Disproportionierung von reduzierten Schwefelverbindungen konnten nicht gefunden werden. In Anreicherungskultur MB2 bei pH 3 lag der pH zum Zeitpunkt t_0 nach Zugabe von Na_2S (5 mM) im Mittel bei 3,9. In den ersten 28 Tagen lag die $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Konzentration bei ca. 4 mM. Eine $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Freisetzung konnte erst nach 40 Tagen beobachtet werden. Bis zum Versuchsende stieg die $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Konzentration mit einer Rate von $69 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf 11,07 mM. Zum Versuchsende lag der pH im Durchschnitt bei 5,9.

Bei pH 5 lag der pH nach der Zugabe von Na_2S (5 mM) im Mittel bei 5,5 und stieg bis zum Versuchsende auf 6,3 an. Die $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Konzentration lag zu Versuchsbeginn bei 4 mM und stieg ab Versuchstag 28 mit einer $\text{Fe}(\text{II})_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrate von ca. $64 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf ca. 10 mM an. In allen chemischen und biologischen Kontrollansätzen bei pH 3 und pH 5 konnte

über die gesamte Versuchszeitspanne von 126 Tagen keine signifikante Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration beobachtet werden.

In Anreicherungskultur MB2 unter pH 3-Bedingungen konnten von dem zugesetzten Na_2S (5 mM) zum Zeitpunkt $t_{0,04}$ 44% in Form von elementarem Schwefel (2,21 mM) wiedergefunden werden. Zum Versuchsende hin nahm die Konzentration von S^0 um 1,34 mM ab. Eine komplette Oxidation der 1,34 mM S^0 zu Sulfat würden einen Transfer von 8,04 mM Elektronen auf einen Elektronenakzeptor (z.B. Fe(III)) bei gleichzeitiger Zunahme der Sulfatkonzentration um 1,34 mM bedeuten. Die Zunahme im $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ betrug 7,11 mM, was einer Wiederfindung der Elektronen von 88% entspricht. In der gleichen Zeitspanne kam es zu einer Zunahme in der Sulfatkonzentration von 4,08 mM, was den zu erwartenden Wert von 1,34 mM um den Faktor 3 überstieg. Die überschüssigen 2,7 mM Sulfat könnten aus dem Schwertmannit stammen, wie schon bei der Stimulierung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung durch elementarem Schwefel (siehe 3.18) beschrieben. Einen Anstieg im AVS, der für eine Disproportionierung sprechen würde, konnte nicht beobachtet werden (Tabelle 3.13).

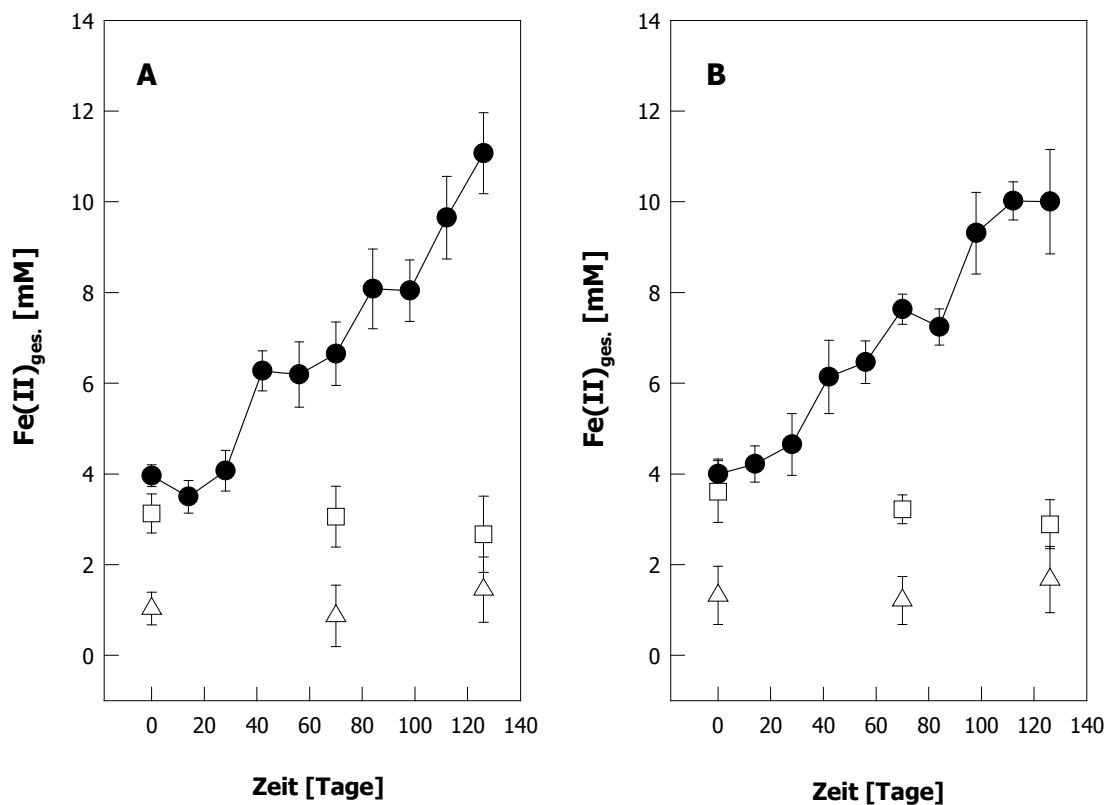


Abbildung 3.26 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung (●) aus Schwertmannit_{sterilf.} mit 5 mM Na_2S bei pH 3 (**A**) und (**B**); und in den Kontrollansätzen mit Inokulum ohne Na_2S (△) und ohne Inokulum mit Na_2S (○). Bei den Dargestellten Messwerten handelt es sich um Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus jeweils zwei Parallelansätzen.

Unter pH 5-Bedingungen ergab sich ein ähnliches Bild wie bei pH 3. Zum Zeitpunkt $t_{0,04}$ konnte das zugegebene Na_2S zu 61% in Form von S^0 wiedergefunden werden. Bis zum Versuchsende kam es zu einer Abnahme im S^0 von 1,31 mM. Eine komplette Oxidation zu Sulfat würde eine Übertragung von 7,86 mM Elektronen bedeuten, die sich in der Zunahme von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ um 6 mM zum größten Teil wieder finden lassen. Auch in diesen Ansätzen konnte für eine Disproportionierung sprechende Zunahme im AVS-Pool nicht gemessen werden.

In den chemischen Kontrollansätzen konnte wie schon bei den Versuchen zur chemischen Reaktion von Na_2S mit Fe(III) beschrieben (siehe 3.16) nach der Zugabe von Na_2S eine Zunahme bei $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$, TRIS, AVS und S^0 beobachtet werden. Diese verschiedenen Verbindungen blieben über die Zeit stabil. Lediglich beim AVS kam es zu einer Abnahme. Ein Eindringen von Luftsauerstoff konnte jedoch ausgeschlossen werden, da $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ auch zu Versuchsende gemessen wurde.

Tabelle 3.13 Gehalte der unterschiedlichen anorganischen Schwefelverbindungen und $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration in der Anreicherungskultur MB2 bei pH 3 und pH 5 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten.

	MB2 – pH 3			MB2 – pH 5		
	t_0	$t_{0,04}$	t_{Ende}	t_0	$t_{0,04}$	t_{Ende}
Sulfat [mM]	6,41 ($\pm 0,71$)	4,68 ($\pm 0,86$)	8,76 ($\pm 0,92$)	5,43 ($\pm 0,84$)	4,24 ($\pm 0,62$)	9,68 ($\pm 1,02$)
Fe(II) [mM]	0,08 ($\pm 0,03$)	3,96 ($\pm 0,24$)	11,07 ($\pm 0,89$)	0,09 ($\pm 0,06$)	4,00 ($\pm 0,33$)	10,00 ($\pm 1,15$)
TRIS [mM]	0,03 ($\pm 0,01$)	4,20 ($\pm 1,09$)	1,69 ($\pm 0,52$)	0,00 ($\pm 0,00$)	2,46 ($\pm 1,27$)	2,04 ($\pm 0,87$)
AVS [mM]	0,02 ($\pm 0,01$)	0,47 ($\pm 0,34$)	0,12 ($\pm 0,03$)	0,00 ($\pm 0,00$)	1,32 ($\pm 0,58$)	0,32 ($\pm 0,11$)
S^0 [mM]	0,00 ($\pm 0,00$)	2,21 ($\pm 0,58$)	0,87 ($\pm 0,36$)	0,00 ($\pm 0,00$)	3,07 ($\pm 0,81$)	1,76 ($\pm 0,63$)

Tabelle 3.14 Gehalte der unterschiedlichen anorganischen Schwefelverbindungen und $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration in den Ansätzen zur chemischen Kontrolle bei pH 3 und pH 5 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten.

	chem. Kontrolle - pH 3			chem. Kontrolle - pH 5		
	t_0	$t_{0,04}$	t_{Ende}	t_0	$t_{0,04}$	t_{Ende}
Sulfat [mM]	6,75. ($\pm 0,52$)	5,02 ($\pm 0,93$)	5,66 ($\pm 0,92$)	5,99 ($\pm 0,32$)	4,78 ($\pm 0,82$)	4,58 ($\pm 0,61$)
Fe(II) [mM]	0,11 ($\pm 0,02$)	3,13 ($\pm 0,43$)	2,67 ($\pm 0,84$)	0,34 ($\pm 0,10$)	3,61 ($\pm 0,68$)	2,89 ($\pm 0,54$)
TRIS [mM]	0,07 ($\pm 0,03$)	3,63 ($\pm 0,94$)	4,16	0,01 ($\pm 0,00$)	3,02 ($\pm 0,87$)	2,64 ($\pm 1,06$)
AVS [mM]	0,04 ($\pm 0,01$)	0,73 ($\pm 0,62$)	0,51 ($\pm 0,22$)	0,01 ($\pm 0,00$)	2,07 ($\pm 0,88$)	0,32 ($\pm 0,21$)
S° [mM]	0,00 ($\pm 0,00$)	2,70 ($\pm 0,88$)	2,21 ($\pm 0,76$)	0,00 ($\pm 0,00$)	2,67 ($\pm 0,90$)	2,16 ($\pm 0,74$)

3.23 Anreicherungskultur MB3

Aus einem unbehandeltem Mikrokosmos aus Zone III wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-3} in Mineralmedium mit 40 mM Fe(OH)_3 und 5 mM Na_2S angeimpft und bei 20°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-3} ohne Na_2S angesetzt (Abbildung 3.27). In den inokulierten Ansätzen konnte in allen Verdünnungsstufen eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über die Versuchszeitspanne von 35 Tagen beobachtet werden. Diese setzte bei der Verdünnungsstufe 10^{-1} unmittelbar ein. In der Verdünnungsstufe 10^{-2} kam es mit 5 Tagen, in der Verdünnungsstufe 10^{-3} mit ca. 12 Tagen zu einer Verzögerung in der Freisetzung von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$. Im Gegensatz zu den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 kam es in diesen Kulturansätzen zu einer Schwarzverfärbung der Fe-Festphase, was als Indiz für eine Schwefeldisproportionierung gewertet wurde. Die Röhrchen der Verdünnungsstufe 10^{-3} wurde weitertransferiert (sie wird im Nachfolgenden nur noch als MB3 bezeichnet). In den inokulierten Kontrollansätzen ohne Na_2S konnte nur in der geringsten Verdünnungsstufe (10^{-1}) eine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über die Versuchszeitspanne von 35 Tagen beobachtet werden.

Mit MB3 konnte eine stabile Anreicherungskultur mit elementarem Schwefel als Elektronendonator bei pH 5 aus Zone III gewonnen werden, die eine im Vergleich zu den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 12fach höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates aufwies. Bei Anreicherung MB3 lag die Eisenreduktionsrate bei ca. $600 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und zeigte somit eine ca. 12fach höhere $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates als die Anreicherungskulturen MB1 und MB2.

Auch morphologisch unterschieden sich die Bakterienzellen der Anreicherungskultur MB3 von denen aus MB1 und MB2. In der Anreicherungskultur MB3 waren kurze, gerade und teilweise bewegliche Stäbchen die dominierende Form. Sporenbildende Zellen konnte nicht beobachtet werden.

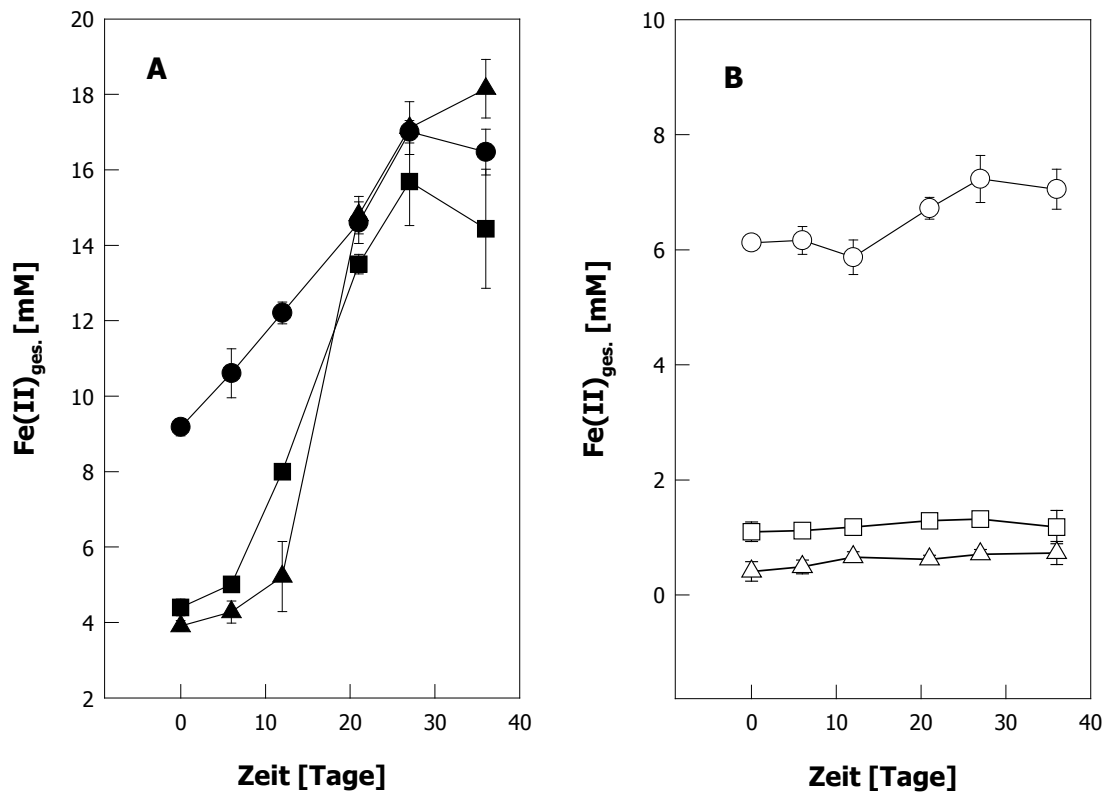


Abbildung 3.27 Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in den mit Sedimentmaterial aus Zone III **(A)** inokulierten Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ in Mineralmedium mit 40 mM Fe(OH)₃, 5 mM Na₂S und CO₂. **(B)** inokulierten Kontrollansätze ohne Na₂S.

3.24 Isolierung von MB3

Aus Anreicherungskultur MB3 konnte eine Reinkultur durch mehrfaches Ausverdünnen und Transfers in Tiefagar-Verdünnungsreihen gewonnen werden. Wie schon für die Anreicherungskulturen MB1 und MB2 beschrieben, konnte aus Anreicherungskultur MB3 auf Agar-Platten weder mit Na₂S noch mit Thiosulfat ein Wachstum erzielt werden (Anzuchtbedingungen wie für MB1 und MB2), weshalb eine Aufreinigung über Verdünnungsreihen und Tiefagar-Verdünnungsreihen vorgenommen wurde.

Im rötlich braunen Fe(OH)₃ konnte in der Verdünnungsstufe 10⁻¹ nach zwei bis drei Tagen die Bildung von schwarzen Punkten beobachtet werden. Nach einer Woche war die komplette Eisenfestphase schwarz gefärbt. Dies wurde als Indiz für eine Eisensulfid-Bildung gewertet wurde. Mit Zunahme der Inkubationsdauer kam es auch in den höheren Verdünnungsstufen

(maximal bis 10^{-5}) zur Schwarzfärbung der Eisenfestphase. Nach zwei Wochen wurden frische Verdünnungsreihen angelegt, wobei die höchste positive Verdünnungsstufe der vorherigen Verdünnungsreihe als Inokulum verwendet wurde. Insgesamt wurden fünf Folgetransfers vorgenommen. Mikroskopische Untersuchungen zeigten mindestens drei verschiedene Zelltypen. Neben kurzen unbeweglichen Stäbchen konnten leicht gekrümmte und bewegliche Stäbchen sowie dicke Stäbchen mit leicht verdicktem Zellenden unterschieden werden. Zur Gewinnung einer Reinkultur wurde daher eine Agar-Verdünnungsreihe angelegt (siehe 2.4.3).

In den Agar-Röhrchen der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} konnten nach ca. 4 Wochen eine Schwarzfärbung der $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -haltigen Agarschicht beobachtet werden. In den höheren Verdünnungsstufen (bis 10^{-5}) konnte auch nach acht Wochen keine Bildung von Eisensulfiden beobachtet werden. In den Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} waren kleine weißliche Kolonien zu erkennen, von denen jeweils fünf Kolonien mittels einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agar entnommen und einzeln in frisches Mineralmedium (40 mM $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 20 mM S^0 , pH 5) transferiert wurden. Nach einer Inkubationsdauer von drei Wochen konnte in 4 dieser Ansätze eine Eisensulfidbildung beobachtet werden. Von diesen vier Kulturen wurde ein Kulturansatz noch zweimal einer Vereinzelung durch eine Agar-Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-6}) unterzogen. Aus der letzten Tiefagar-Verdünnungsreihe wurde nach fünf Wochen Inkubation aus der Verdünnungsstufe 10^{-3} acht vereinzelte Kolonien steril entnommen und in Flüssigmedium transferiert. In diesen acht Kulturansätzen konnte nach drei Wochen eine Eisensulfidbildung in fünf Ansätzen beobachtet werden. Mikroskopisch waren alle fünf Kulturen morphologisch gleich. Es konnten leicht gekrümmte und bewegliche Stäbchen unterschieden werden. Zusätzlich wurden alle fünf Kulturen einer DGGE-Analyse unterzogen. Hieraus ergab sich, dass alle vier Kulturen die gleiche Bande aufwiesen.

Isolat MB3 konnte nur in Gegenwart von Fe-Mineralen die Schwefelverbindungen S^0 und Thiosulfat disproportionieren und zeigte ein chemolithoautotrophes Verhalten. Ohne Zugabe einer Fe-Quelle konnte kein Wachstum festgestellt werden. In diesen Ansätzen konnte eine geringe Sulfidbildung nachgewiesen werden, wobei die Sulfidkonzentration nach drei Wochen bei maximal 120 μM betrug. Mit Sulfit als Schwefelquelle konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Isolat MB3 zeigte in einem sehr engen pH-Spektrum von 5,0 bis 6,5 eine Aktivität. Das Optimum lag zwischen 5,5 und 6,0. In den pH-neutralen Ansätzen mit pH 7 konnte nach einer Inkubationsdauer von zwei Tagen eine Bildung von drei bis fünf kleinen schwarzen Punkten beobachtet werden. Dieser "optische" Zustand blieb über eine Dauer von zehn Tagen konstant. Erst nach 23 Tagen, konnte auch in diesen Ansätzen eine

deutliche Schwarzfärbung der Fe(III)-Festphase beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war der pH-Wert in diesen Ansätzen auf 6,02-6,15 abgesunken.

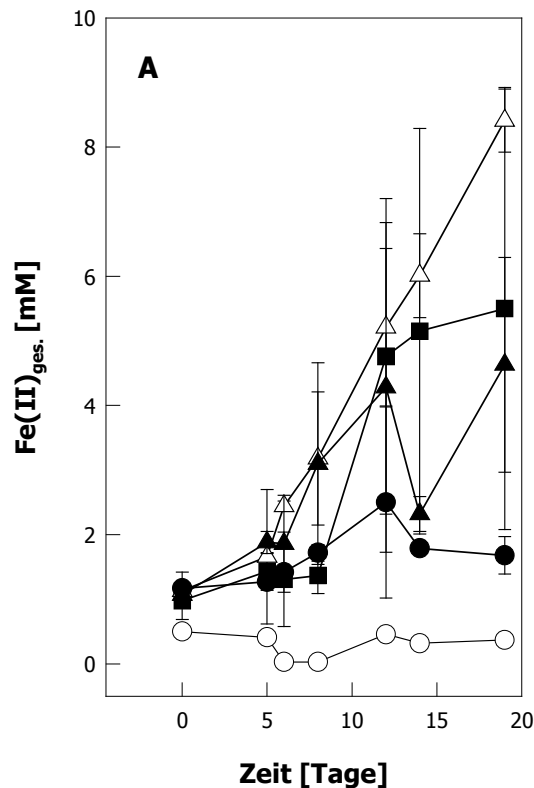


Abbildung 3.28 $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung aus Fe(OH)_3 durch MB3 bei der Schwefeldisproportionierung bei den Temperaturen 2°C (○), 15°C (△), 20°C (■), 30°C (▲) und 40°C (●). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus jeweils drei parallelen Ansätzen.

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde MB3 bei den Temperaturen 2, 15, 20, 30 und 40°C inkubiert. Die höchste $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates wurde mit $480 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ bei einer Temperatur von 20°C gemessen. Bei 15°C betrug die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates $375 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und 30°C $213 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Die geringste $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates wurde bei 40°C mit $26 \mu\text{mol l}^{-1} \text{d}^{-1}$ bestimmt. Bei 2°C konnte keine $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung beobachtet werden.

MB3 konnte mit H_2 und Formiat (5 mM) geringe Mengen an Sulfat (5 mM) bei pH 5,5 reduzieren. In diesen Ansätzen wurde nach einer Inkubationsdauer von 24 Tagen eine Sulfidkonzentration von 65 bzw. $92 \mu\text{mol l}^{-1}$ gemessen. Eine entsprechende Abnahme im Sulfat konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht beobachtet werden. In Ansätzen mit Laktat (5 mM), Acetat (5 mM) oder Glukose (5 mM) in Gegenwart von Sulfat (10 mM) konnte hingegen keine Sulfidbildung nachgewiesen werden. In keinem Ansatz konnte Zellwachstum (Trübungsmessung) beobachtet werden.

Tabelle 3.15 Sulfatkonzentration zu Versuchsbeginn (t_0) und Versuchsende (t_{Ende}) in Kultur MB3 mit unterschiedlichen Elektronendonoren. Bei den dargestellten Konzentrationswerten handelt es sich um den Mittelwert aus zwei Parallelansätzen sowie der Standardabweichung.

	t_0	t_{Ende}
Laktat	5,05 ($\pm 0,21$)	4,98 ($\pm 0,17$)
Acetat	4,97 ^{a)}	4,88 ($\pm 0,26$)
Formiat	5,12 ($\pm 0,19$)	5,00 ($\pm 0,13$)
Glukose	5,23 ($\pm 0,11$)	5,11 ^{a)}
H ₂	4,97 ($\pm 0,21$)	4,54 ^{a)}

^{a)} Einzelwert

Stamm MB3 ist ein Vertreter der δ -Proteobakterien und gehört zu der Gruppe um *Desulfocapsa sulfoexigens* (FINSTER ET AL. 1998) und *Desulfocapsa thiozymogenes* (JANSSEN ET AL. 1996). Die größte phylogenetische Ähnlichkeit hat Stamm MB3 mit der Klonsequenz GOUTA17 (ALFREIDER ET AL. 2002). Die Ähnlichkeit dieser zwei Sequenzen beträgt 99,5%. Der Klon GOUTA17 wurde aus einem Versuchsreaktor zum Abbau von Chlorbenzol in kontaminierten Grundwässern isoliert.

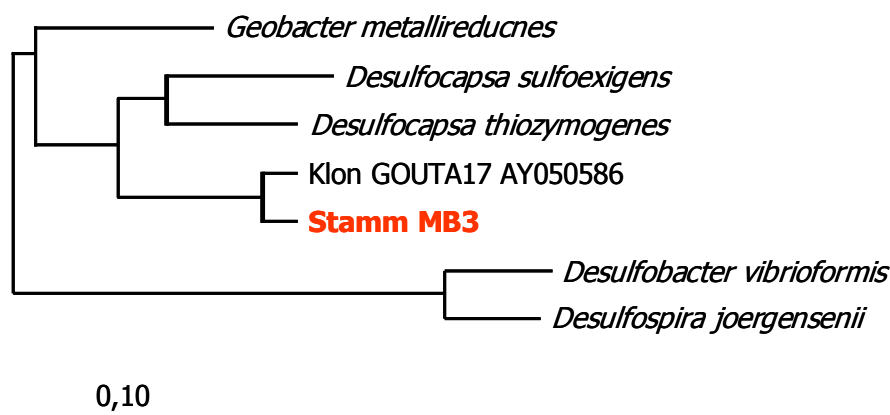


Abbildung 3.29 Phylogenetischer Baum basierend auf der 16s rDNA-Gensequenz von Stamm MB3 und den nächsten verwandten Sequenzen.

3.25 Zeitlicher Verlauf der Schwefel- und Thiosulfat-Disproportionierung durch Isolat MB3 mit 5 mM Sulfid und 10 mM Thiosulfat bei pH 5,5

Elementarer Schwefel und Thiosulfat wurden durch MB3 bei pH 5,5 disproportioniert. Eine Disproportionierung erfolgte allerdings nur in Gegenwart von Eisenhydroxiden. In diesen Ansätzen konnte nach 24-48 h eine Verfärbung der Eisenfestphase beobachtet werden. Nach 20 Tagen zum Zeitpunkt t_{Ende} war in allen Ansätzen die Eisenfestphase komplett schwarz. In

Ansätzen ohne Eisenhydroxiden konnte nach 4 Tagen mit elementarem Schwefel eine Sulfidkonzentration von $119 \mu\text{mol l}^{-1}$ und mit Thiosulfat von $106 \mu\text{mol l}^{-1}$ nachgewiesen werden. Über eine Inkubationsdauer von 38 Tagen konnte keine weitere Zunahme beobachtet werden. Der elementare Schwefel nahm über eine Zeitspanne von 12 Tagen ab. Mit dem Verbrauch an S^0 stiegen gleichzeitig die Konzentrationswerte für Sulfat und $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ an. Freies Sulfid konnte in diesen Ansätzen nicht nachgewiesen werden. Zum Versuchsende lag das Verhältnis $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}:\text{Sulfat}$ bei 2,03:1. Dieser Wert entsprach dem für die Disproportionierung von S^0 in Gegenwart von Eisenhydroxiden erwarteten Verhältnis von 2:1 (THAMDRUP ET AL. 1993).

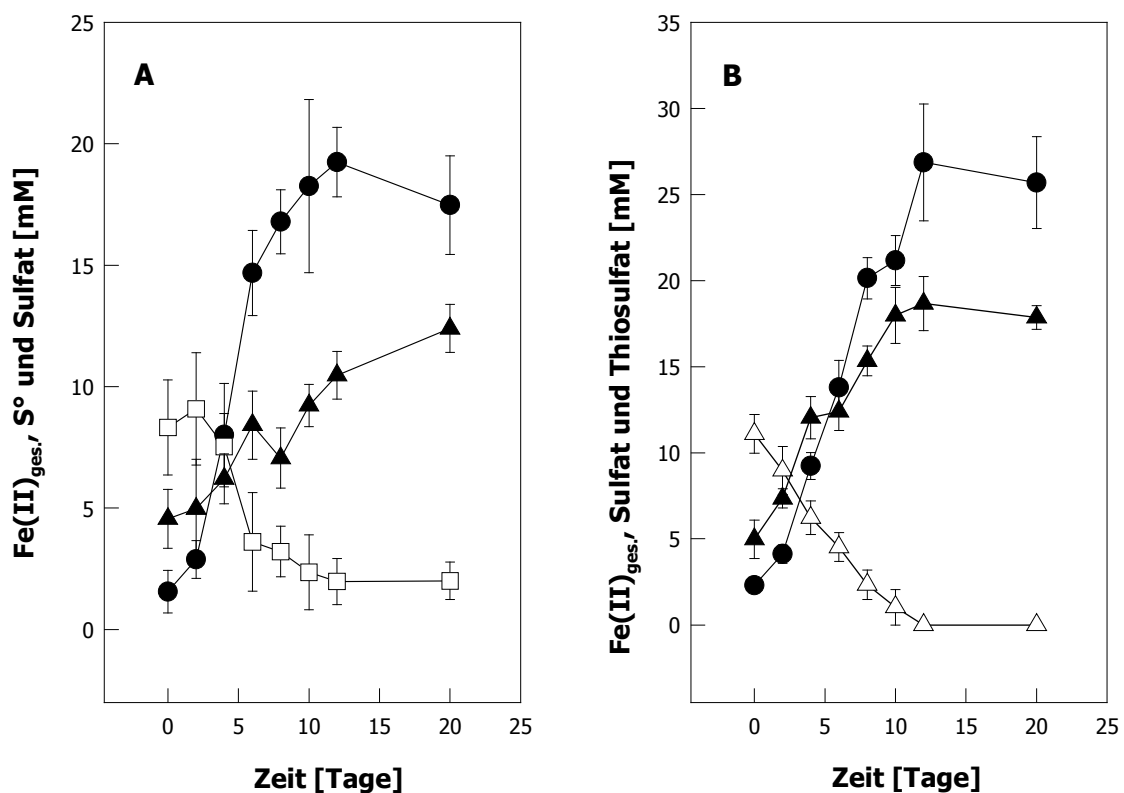


Abbildung 3.30 Freisetzung von $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ aus Fe(OH)_3 und von Sulfat aus elementarem Schwefel (A) oder Thiosulfat (B) durch Anreicherungskultur MB3. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Parallelen mit den Standardabweichungen. Fe(II) (●); S^0 (□); Thiosulfat (△); Sulfat (▲).

Das zugesetzte Thiosulfat (ca. 11 mM) wurde über eine Zeitspanne von 10 Tagen komplett verbraucht. Zum Zeitpunkt t_{Ende} konnte elementarer Schwefel mit 0,78 mM bestimmt werden. Dies zeigt, dass das bei der Disproportionierung von Thiosulfat gebildete Sulfid an Fe(III) teilweise zu S^0 oxidiert wird. Daher ist das Verhältnis Thiosulfat:Sulfat auch nicht 1:1 wie in Fe(III) -freiem Medium zu erwarten wäre (FINSTER ET AL. 1998). Dadurch, dass das gebildete Sulfid teilweise chemisch durch das Eisenhydroxyd zu S^0 oxidiert wird, das dann einer

weiteren Disproportionierung zur Verfügung steht, ergibt sich eine höhere Sulfatbildung aus dem Thiosulfat. Daher liegt das Verhältnis Thiosulfat:Sulfat bei 0,65:1.

Tabelle 3.16 Konzentration von Fe(II) und den Schwefelverbindungen zum Versuchsbeginn (t_0) und zum Versuchsende (t_{Ende}) bei der Disproportionierung von elementarem Schwefel und Thiosulfat durch Isolat MB3 bei pH 5 in Gegenwart von 40 mM Fe(OH)₃.

Verbindung	t_0	t_{Ende}	
S⁰ [mM]	8,32 (± 1,95)	2,01 (± 0,77)	
TRIS [mM]	6,43 (± 2,41)	5,34 (± 0,95)	
AVS [mM]	0,12 (± 0,02)	3,76 (± 1,75)	Fe ²⁺ : SO ₄ ²⁻ 2,03 : 1
Fe(II) [mM]	1,56 (± 0,87)	17,48 (± 2,03)	
Sulfat [mM]	4,56 (± 1,22)	12,4 (± 0,99)	
Zellen/ml^{a)}	1,76 × 10 ⁶ ^{b)}	4,03 × 10 ⁸ (± 4,1 × 10 ³)	
Thiosulfat [mM]	11,1 (± 1,12)	0 ^{b)}	
S⁰ [mM]	0	0,78 (± 0,31)	
TRIS [mM]	4,12 ^{b)}	6,87 (± 0,34)	S ₂ O ₃ ²⁻ : SO ₄ ²⁻ 0,65 : 1
AVS [mM]	0,13 (± 0,05)	5,66 (± 1,91)	
Fe(II) [mM]	2,31 (± 0,34)	25,69 (± 2,67)	
Sulfat [mM]	4,98 (± 1,12)	17,86 (± 0,68)	
Zellen/ml^{a)}	0,96 × 10 ⁶	8,89 × 10 ⁷	

^{a)} Einzelbestimmung; ^{b)} Einzelwert

Sowohl mit Thiosulfat als auch mit elementarem Schwefel kam es in der Gegenwart von Fe(III) zur Bildung von TRIS und AVS. Die Pyrit-Berechnung zum Zeitpunkt t_{Ende} aus den Mittelwerten für AVS, TRIS, S⁰ oder Thiosulfat ergab keine nennenswerte Pyrit-Bildung. Der Pyrit-Wert bei der S⁰-Disproportionierung betrug -0,42 mM, der Pyrit-Wert bei der Thiosulfat-Disproportionierung betrug 0,43 mM. Bei der Disproportionierung beider Schwefelverbindungen kam es zu einer Zunahme in der Zellzahl/ml. Bei der Thiosulfat-Disproportionierung stieg die Zellzahl von 0,96 × 10⁶ Zellen/ml zum Zeitpunkt t_0 auf 8,89 × 10⁷ Zellen/ml zum Versuchsende an. Bei der Schwefel-Disproportionierung konnte ein Wachstum beobachtet werden. Die Zellzahl nahm von 1,76 × 10⁶ Zellen/ml zu Versuchsbeginn auf 4,03 × 10⁸ Zellen/ml zum Versuchsende hin zu.

4 Diskussion

Die Reduktion von Fe(III) spielt in zahlreichen anoxischen Systemen eine wichtige Rolle. Für die anoxischen und eisenreichen Sedimente in Minenabwässern wurde der Prozess der Fe(III)-Reduktion aufgrund von erhöhten Fe(II)-Konzentrationen häufig postuliert (JOHNSON ET AL. 1993, CUMMINGS ET AL. 2000) und in den letzten Jahren durch eine Vielzahl von Untersuchungen durch die direkte Messung der Fe(II)-Freisetzung belegt (z.B. KÜSEL ET AL. 1999, ROTH 2000, WENDT-POTTHOF UND MEIER 2000, PEINE ET AL. 2000).

Zahlreiche kultivierungsabhängige mikrobiologisch-ökologische Untersuchungen wurden an sauren Minenabwässern durchgeführt, seit dem das mögliche biotechnologische Potential der in diesen Systemen lebenden Mikroorganismen erkannt wurde (HALLBERG UND JOHNSON 2001, HARRISON 1985, SAND ET AL. 1992, LÓPEZ-ARCHILLA ET AL. 2001). Nur in wenigen Studien erfolgte eine Erfassung der mikrobiellen Diversität über molekularbiologische Untersuchungsmethoden (GOEBEL UND STACHEBRANDT 1994, WULF-DURAND ET AL. 1997, SCHRENK ET AL. 1998, BOND ET AL. 2000A, BOND ET AL. 2000B). Bei all diesen Untersuchungen lag der Schwerpunkt auf den oxischen Bereichen, während zur mikrobiellen Diversität in sauren und anoxischen Sedimentbereichen bisher nur wenige Untersuchungen vorliegen (CUMMINGS ET AL. 2003, PETRIE ET AL. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit molekularbiologischen Methoden die mikrobielle Diversität und Struktur im anoxischen Sediment von Restsee 77 untersucht. Neben der allgemeinen wurde auch die eisenreduzierende sowie die sulfatreduzierende Mikrobiota in ihrer Zusammensetzung untersucht. Weiterhin wurde die mikrobielle Kopplung der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen an die Reduktion von Fe(III) sowie die Verwendung von kohlebütigem Kohlenstoff als Elektronendonator für die Fe(III)-Reduktion untersucht.

4.1 Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77

Im Sediment von Restsee 77 kam es mit zunehmender Tiefe zur Änderung in verschiedenen geochemischen Faktoren. Im oberen Sedimentbereich (Zone I) lag der pH konstant bei 3 und stieg mit der Tiefe auf einen Wert von ca. 6 in der Zone IV an. Der Anstieg im pH erfolgte nicht kontinuierlich. Es erfolgte vielmehr ein pH-Sprung innerhalb von ca. 2 cm in der Zone II. Mit dem pH-Anstieg kam es gleichzeitig zu einem Anstieg in den Konzentrationswerten für Fe(II)_{ges.} und Sulfat. Parallel zum pH-Anstieg kam es zu einer Zunahme in der Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsrate, welche in der Zonen III um den Faktor 2,3 über der Fe(II)_{ges.}-Freisetzungsrate in Zone I lag. Bei der Betrachtung der Fe(II)_{ges.}-

Freisetzungsraten in Bezug auf das Trockengewicht kam es jedoch zu einer Umkehrung der Reihenfolge, da mit zunehmender Sedimenttiefe der Anteil des Trockengewichts von 8 auf über 30% zunahm. In diesem Fall lag die $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrate in der Zone I um den Faktor 1,4 über der in Zone III. Ähnliche Beobachtungen zur $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung im Sediment von Restsee 77 wurden bereits beschrieben (ROTH 2000).

4.1.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment

Der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77. Die Fe(III)-Reduktion in Mikrokosmen aus der Zone I ließ sich durch eine pH-Anhebung um den Faktor 2 im Vergleich zum *in situ* pH stimulieren. Im Gegensatz hierzu waren die Ergebnisse mit den Zone III Mikrokosmen nicht so eindeutig. Hier ergab sich eine tendenzielle Absenkung der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrate im Vergleich zum *in situ* pH von 5-5,5. Vergleichbare Untersuchungen am Sediment von Restsee 77 ergaben eine Stimulierung der Fe(III)-Reduktion in der Zone I bei den pH-Werten von 4 und 4,8 mit einer maximalen Stimulierung bei pH 4, während in Zone III durch eine pH-Absenkung kein stimulierender Effekt ermittelt wurde (ROTH 2000).

Diese Ergebnisse waren insofern überraschend, da azidophile Spezies für den Elektronentransfer auf Fe(III) keinen direkten Kontakt zu den Fe(III)-Oxiden benötigen; sie nutzen statt dessen den kleinen Pool an löslichem Fe(III) für die Reduktion (BRIDGE UND JOHNSON 1998). Dies bedeutet in der Konsequenz, dass die Reduktion von Fe(III) abhängig von der Löslichkeit von Fe(III) ist, welche mit steigendem pH sinkt. Unter sauren pH-Bedingungen (pH 3) können Fe(III)-Konzentrationen von über 10 mM erreicht werden, während unter neutralen pH-Bedingungen (pH 7) nur maximal 10^{-15} mM Fe(III) erreicht werden (LINDSAY UND SCHWAB, 1982). Bereits oberhalb von pH 4 liegt Fe(III) fast ausschließlich in Form von Fe(III)-Hydroxyd vor.

Zusätzlich zur gesteigerten Löslichkeit von Fe(III) bei niedrigen pH-Werten, ist auch die Reduktion von Fe(III) unter sauren Bedingungen im Vergleich zu pH-neutralen Bedingungen energetisch zu bevorzugen, da das Standard-Redoxpotential von Fe(III)/Fe(II) pH-abhängig ist (STRAUB ET AL. 2001). Das Standard-Redoxpotential für gelöstes Fe(III)/Fe(II) nimmt von +770 mV bei pH 0 auf +200 mV bei pH 7 ab. Weiterhin unterscheiden sich auch die Fe-Mineralie in ihrem Redoxpotential. So liegt dies für Ferrihydrit bei -100 mV, für Goethit bei -274 mV und für Magnetit bei -314 mV. Daher ist die Verfügbarkeit von Fe(III) für die mikrobielle Reduktion unter oxischen Bedingungen energetisch begünstigt. Diese Fähigkeit, Fe(III) unter sauren Bedingungen auch in Gegenwart von Sauerstoff zu reduzieren, konnte für *A. cryptum* JF-5 gezeigt werden (KÜSEL ET AL. 2002). Eine Anhebung des pH hat daher aus energetischer Sicht einen negativen Einfluss auf die Fe(III)-Reduktion durch azidophile

Mikroorganismen. Das dennoch eine Stimulierung in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrates in den Zone I Mikrokosmen beobachtet wurde, lässt sich durch zwei Faktoren erklären.

Durch die pH-Anhebung in Zone I konnte neben der stimulierten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung eine lag-Phase von 5 Tagen beobachtet werden. In anderen Untersuchungen konnte ebenfalls eine lag-Phase nach einer pH-Anhebung in der Zone I beobachtet werden (ROTH 2000). Von der Autorin wurde vermutet, dass hier eine vorher wenig aktive, zur Fe(III) -Reduktion befähigte mikrobielle Population durch die pH-Anhebung stimuliert wurde. Für diese Population kommen neben azidotoleranten Mikroorganismen auch neutrophile Populationen in Frage, deren Vorkommen trotz der für sie ungünstigen vorherrschenden Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Eine weitere mögliche Erklärung besteht darin, dass es durch die pH-Anhebung zu einer verstärkten Freisetzung des an den Fe(III) -Mineralen gebundenen organischen Kohlenstoffs kommt (siehe auch 4.3.1).

4.2 Einfluss der geochemischen Parameter auf die Mikrobiota

Einen ersten Hinweis darauf, dass der pH im Sediment einen Einfluss auf die Mikrobiota hat, ergab sich aus der Bestimmung der Gesamtzellzahl im Sediment. Über eine Tiefe von 17 cm ergab sich eine negative Korrelation mit dem pH-Wert. In der Zone I lag die Gesamtzellzahl zwischen $1,64$ und $2,0 \times 10^9$ Zellen/ml. Mit zunehmender Tiefe sank die Zellkonzentration um den Faktor 2,2 und erreichte bei 15 cm in Zone III den geringsten Wert von $9,01 \times 10^8$ Zellen/ml. Vergleichbar hohe Gesamtzellzahlen konnten z.B. aus arktischen marinen Sedimenten erzielt werden (SAHM UND BERNINGER 1998, LLOBET-BROSSA ET AL. 1998, RAVENSCHLAG ET AL. 2001). Der abnehmende Verlauf der Zellzahlen ist typisch für Sedimente. So wurden z.B. für marine Sedimente Abnahmen in der Zellzahl um den Faktor 3 in den oberen 28 cm beschrieben (SAHM UND BERNINGER 1998) und im Wattenmeer nahm die Gesamtzellzahl um den Faktor 2,4 in den obersten 5 cm des Sediments ab (LLOBET-BROSSA ET AL. 1998).

Die Erfassung der allgemeinen Diversität über Klonbibliotheken aus den Zonen I und III zeigten einen deutlichen Unterschied. Ein Vergleich der erhaltenen Klone aus Zone I und Zone III in Bezug auf ihre phylogenetische Gruppenzugehörigkeit ergab, dass in Zone III eine im Vergleich zu Zone I höhere Diversität gefunden werden konnte. In Zone I konnten Klonsequenzen aus 10 unterschiedlichen Gruppen gefunden werden. In Zone III waren es hingegen 12 unterschiedliche Gruppen. Es gab hierbei sowohl Gruppen, die in beiden Zonen nachgewiesen werden konnten, als auch Gruppen, die jeweils nur in Zone I oder in Zone III auftraten. So konnten Klonsequenzen aus den Gruppen β -Proteobakterien, *Firmicutes* und Actinomyceten nur in Zone I nachgewiesen werden, während z.B. Klonsequenzen aus den

Gruppen *Verruimicrobia*/Subdivision 5, *Thermus/Deinococcus*, OP3 oder der *Bacillus-Clostridium*-Gruppe nur in Zone III nachgewiesen werden konnten. Die Betrachtung der Deckungsgrade der Klonbibliotheken, die für Zone I bei 85% und für Zone III bei 65% lag, zeigt, dass die Diversität in Zone III in einem deutlich geringen Ausmaß als in Zone I erfasst wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein weiteres Klonscreening zu einer noch höheren Diversität geführt hätte.

Die beobachteten Unterschiede in der Zusammensetzung sowohl in den allgemeinen als auch in den DGGE-Klonbibliotheken aus der Zone I und Zone III können durch den jeweils unterschiedlichen pH-Wert erklärt werden. Theoretisch wäre hier auch ein Einfluss durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Eisenminerale in den einzelnen Zonen denkbar. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse, dass sowohl in Zone I als auch in Zone III Vertreter der *Acidiphilium*-Spezies, *Acidithiobacillus* und *Geobacter* gefunden wurden. Ob jedoch die unterschiedlichen Eisenminerale in den zwei untersuchten Zonen einen Einfluss auf die Gesamtanzahl der Fe(III)-Reduzierer hat, kann mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen nicht beurteilt werden. Insgesamt konnte über die allgemeinen Klonbibliotheken eine unterschiedliche Struktur der Mikrobiota in den Zonen I und III sowie eine höhere Diversität in Zone III ermittelt werden. Die Ergebnisse ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Fe(III)-reduzierende Mikrobiota.

4.2.1 Azidophile Fe(III)-Reduzierer

Aus den Ergebnissen der 'Verdünnungs-PCR' kann angenommen werden, dass die Diversität der azidophilen heterotrophen Fe(III)-Reduzierer unter pH 5 Bedingungen in Zone III höher ist als in Zone I unter pH 3 Bedingungen. Diese Annahme konnte speziell für die *Acidiphilium*-Arten bestätigt werden. Für diese Gruppe konnten acht unterschiedliche Phylotypen ermittelt werden, wobei hiervon vier ausschließlich in Zone III vorkamen. Die größte Sequenzähnlichkeit wiesen die nur in Zone III auftretenden Klone zu *Acidisphaera rubrifaciens* auf. Hierbei handelt es sich um einen moderat azidophilen (pH 3.5-6.0), aeroben heterotrophen Organismus, der aus sauren Minenabwässern isoliert wurde (HIRAISHI ET AL. 2000). Eine zusätzliche Bestätigung dieses Befundes stellen die Ergebnisse der erstellten DGGE- sowie der allgemeinen Klonbibliotheken dar. Innerhalb dieser Klonbibliotheken konnten Klonsequenzen mit Sequenzähnlichkeiten zu *A. rubrifaciens* nur in den jeweiligen Klonbibliotheken aus der Zone III erhalten werden. Diese Ergebnisse demonstrieren eine höhere Diversität der azidophilen heterotrophen Organismen in der Zone III unter pH 5 Bedingungen. Vertreter der Gattung *Acidiphilium* scheinen die am häufigsten vorkommenden Vertreter von heterotrophen Organismen in sauren Minenwässern zu sein (JOHNSON ET AL. 2001). Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass *Acidiphilium*-Arten bei der Reduktion

von Fe(III) in den Sedimenten saurer Restseen mit verantwortlich sind (KÜSEL ET AL. 1999). Heterotrophe Organismen spielen wahrscheinlich auch in AMD's eine wichtige Rolle, da sie organische Säuren, die unter sauren pH-Bedingungen eine toxische Wirkung auf lithotrophe Organismen wie *L. ferrooxidans* oder *A. ferrooxidans* ausüben, metabolisieren (JOHNSON 1998, BROFFT ET AL. 2002).

Im Kontrast zur Diversität der azidophilen heterotrophen, bei denen ein Unterschied in der Phylogenie zwischen Zone I und Zone III zu erkennen war, stehen die Ergebnisse der azidophilen autotrophen Organismen. Hier konnte sowohl in Zone I als auch in Zone III nur ein Phylotyp mit einer Sequenzähnlichkeit von 99% zu *A. ferrooxidans* unterschieden werden. Aus den Untersuchungsergebnissen zur Reduktion von unterschiedlichen Fe(III)-Mineralen bei unterschiedlichen pH-Werten kann gefolgert werden, dass *A. ferrooxidans* nicht für die im Sediment beobachtete Fe(III)-Reduktion verantwortlich ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen eine mögliche metabolische Diversität von *A. ferrooxidans*-Spezies nicht widerspiegelt. Von anderen Untersuchungen ist bekannt, dass die alleinige Sequenzierung der 16S rDNA oft nicht ausreicht, um Stämme eindeutig zu differenzieren (SASS ET AL. 1998).

Um Sequenzen mit mehr als 95% Ähnlichkeit über eine RFLP zu unterscheiden, ist die Verwendung von mindestens vier Restriktionsenzymen notwendig (ROONEY-VARGA ET AL. 1998). Die in dieser Arbeit angelegten Untersuchungen waren auf die Erfassungen von Unterschieden ausgerichtet, weshalb hier nur zwei Restriktionsenzyme verwendet wurden. Die Ergebnisse zur Diversität der azidophilen autotrophen Organismen stellt somit nur eine Übersicht der minimalen Diversität dar. Es kann angenommen werden, dass ein möglicher Unterschied durch das Screenen einer größeren Anzahl von Klonen unter der Verwendung von vier Restriktionsenzymen aufgezeigt werden könnte. Diese azidophilen autotrophen Organismen spielen eine wichtige Rolle für das *leaching* von Eisenmineralen, und ihre Anwesenheit im oxischen Sedimentbereich von sauren Restseen wurde mehrfach demonstriert (KÜSEL ET AL. 1999, MEIER UND BABENZIEN 2000).

Neben dieser geringen Diversität der azidophilen autotrophen Organismen war ein weiterer Punkt überraschend. Die verwendeten Primer für die „Bioleaching-Gruppe“ wurden speziell für die in derartigen Habitaten vorkommenden azidophilen Organismen wie *A. ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *A. cryptum* und *A. organovorum* entwickelt (WULF-DURAND ET AL. 1997). Dennoch konnte mit insgesamt 37 erhaltenen Klonen aus Zone I und Zone III nur ein einziger Phylotyp mit einer Sequenzähnlichkeit von 99% zu *A. ferrooxidans* aus dem klonierten PCR-Produkt mit diesen Primern erhalten werden. Wie in dieser Arbeit dargestellt, erfolgt aus unterschiedlichen Fe-Mineralen nur unter pH 3 durch *A. ferrooxidans* eine

nennenswerte $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung. Bei höheren pH-Werten war diese sehr gering bzw. gar nicht ausgebildet. Diese Diskrepanz zeigt eine mögliche physiologische Diversität bei Stämmen von *A. ferrooxidans* auf, die sich nicht in der 16S rDNA widerspiegelt. Einen ähnlichen Befund zeigten Untersuchungen zur Fe(III) -Reduktion von *A. cryptum* JF-5 und *A. cryptum*^T (ROTH 2000). Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA-Gene dieser zwei Stämme von 99,6 % zeigen beide Stämme Unterschiede in Bezug auf die Fe(III) -Reduktion bei unterschiedlichen Fe(III) -Mineralen und pH-Werten.

Ähnliche Ergebnisse, jedoch mit kultivierungsabhängigen Methoden, wurden durch Untersuchungen an den Restseen 107 und 111 beschrieben (MEIER 2001). Hier konnten 12 *A. ferrooxidans*-Stämmen aus unterschiedlichen Sedimenttiefen der Restseen 107 und 111 isoliert werden. Diese zeigten im Vergleich untereinander hohe Übereinstimmungen in der partiell sequenzierten 16S rDNA-Sequenz (96-99%), was von der Autorin als Hinweis für eine geringe Diversität bezüglich dieses Phylotyps gewertet wurde. In wieweit diese Isolate sich in ihrer Physiologie unterscheiden, wurde jedoch nicht untersucht.

4.2.1.1 Acidobacteria

Auffällig war, dass Vertreter aus der Gruppe der *Acidobacteria* mit allen angewendeten molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden konnten. Speziell in der allgemeinen Klonbibliothek machten diese Sequenzen in der Zone I und Zone III jeweils über 40% der ermittelten Sequenzen aus. Jedoch konnte bei der in situ Hybridisierung kein positives Signal in den Sedimentproben erhalten werden. Die Häufigkeitsverteilung von phylogenetischen Gruppen in erstellten Klonbibliotheken lässt daher keine Aussage zur Abundanz in der Umweltprobe zu (AMANN ET AL. 1995).

Insgesamt wird die Gruppe der *Acidobacteria* fast ausschließlich durch Klonsequenzen aus den unterschiedlichsten Umweltproben gebildet. Von den acht phylogenetisch definierten Untergruppen der *Acidobacteria* sind die Gruppen 1, 3, 4 und 6 durch Klonsequenzen aus unterschiedlichen Untersuchungen gut beschrieben. Diese Sequenzen wurden aus geothermalen Quellen, Böden mit einer großen Spannweite an physikochemischen Parametern, Moorböden, marinen und Süßgewässern sowie aus Abwässern und AMD's erhalten (eine Übersicht hierzu siehe HUGENHOLTZ ET AL. 1998). Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Acidobakterien einen wichtigen ökologischen Bestandteil in vielen Ökosystemen darstellen. Da die phylogenetische Diversität der *Acidobacteria* annähernd die Diversität der *Proteobacteria* erreicht, ist die Annahme berechtigt, dass auch die physiologische Diversität die der *Proteobacteria* erreicht.

Zur Zeit stehen mit *A. capsulatum* (KISHIMOTO ET AL. 1991), *Goethrix fermentans* (LONERGAN ET AL. 1996) und *Holophaga foetida* (LIESACK ET AL. 1994) nur drei beschriebene Isolate aus

dieser Gruppe zur Verfügung. Bei *A. capsulatum* handelt es sich um ein moderat azidophiles heterotrophes Bakterium mit einem pH-Spektrum zwischen 3 und 6. Für diesen Stamm ist weder ein anaerobes Wachstum, noch die Fähigkeit zur Sulfatreduktion gezeigt worden. Die Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion wurde bisher nicht untersucht. *G. fermentans* und *H. foetida* sind strikt anaerobe Organismen, die zur Fermentation von aromatischen Verbindungen befähigt sind. Bei *G. fermentans* handelt es sich um einen dissimilatorischen Fe(III)-Reduzierer.

Die vorliegende Gesamtmenge an physiologischer Information bezieht sich zur Zeit ausschließlich auf diese drei Isolate. Eine Übertragung dieser Informationen auf die Klonsequenzen in den jeweiligen Gruppen und eine ökosystemare Schlussfolgerung ist jedoch nicht möglich. Auch lassen sich daraus keine spezifischen Fähigkeiten für die einzelnen Gruppen ableiten. Die Tatsache, dass Klonsequenzen dieser Gruppe mit allen molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden konnten, lässt eine wichtige ökologische Rolle für diese Gruppe annehmen. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass neben *G. fermentans* weitere Vertreter der Gruppe der Acidobacteria, die bisher noch gar nicht bzw. nur als Klonsequenz erfasst wurden, zur Fe(III)-Reduktion befähigt sind.

Die dominierende Rolle, die die Klonsequenzen der Acidobacteria in den erstellten Klonbibliotheken einnahmen, sowie die Fähigkeit der Fe(III)-Reduktion von *A. capsulatum* über einen fermentativen Stoffwechselweg von Glukose lassen einen Beitrag zur Fe(III)-Reduktion im Sediment vermuten. Allerdings konnte die Abundanz dieser Gruppe im Sediment mittels FISH nicht ermittelt werden. In wieweit Acidobakterien eine Rolle bei der Reduktion von Fe(III) in sauren Sedimenten spielen, muss daher unbeantwortet bleiben. Dass Fermentation einen Beitrag zur Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77 leistet, zeigt die Isolierung von *Clostridium butyricum*. Dieser Organismus überträgt 2,3% der Reduktionsäquivalente aus Glukose oder Cellubiose auf Fe(III) (KÜSEL ET AL. 1999).

4.2.2 Neutrophile Fe(III)-Reduzierer

Im Gegensatz zu den azidophilen Vertretern konnten mit den unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden nur sehr wenige Klonsequenzen erhalten werden, die sich den typischen neutrophilen Eisenreduzierern wie *Geobacter*, *Geothrix* oder *Shewanella* zuordnen ließen. Diese Gruppen werden allgemein als die wichtigsten dissimilatorischen Eisenreduzierer angesehen. Vertreter dieser Gattungen wurden aus unterschiedlichen neutralen limnischen oder marinen Habitaten sowie Grundwasserleitern isoliert (COATES ET AL. 1996, LOVLEY 1997, LOWE ET AL. 2000, SNOEYENBOS-WEST ET AL. 2000). Dass diese Organismen in einem nur sehr geringen Umfang nachgewiesen werden konnten, spricht dafür, dass diese neutrophilen Fe(III)-Reduzierer im Sediment von Restsee 77 keine nennenswerte Rolle bei

der Fe(III)-Reduktion spielen. Jüngste Untersuchungen bestätigen dies. So konnte mit Acetat oder Laktat, typischen Elektronendonoren für neutrophile Fe(III)-reduzierende Bakterien (LOVLEY 1993, NEALSON UND MYERS 1992, CUMMINGS ET AL. 1999), keine stimulierende Wirkung auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77 beobachtet werden (KÜSEL UND DORSCH 2000). Daher scheint die Oxidation von komplexeren organischen Verbindungen an die Fe(III)-Reduktion in sauren Restseen gekoppelt zu sein. Möglicherweise spielen die neutrophilen Fe(III)-Reduzierer in den moderat sauren bis neutralen Sedimenten von Restseen 111 und Restsee B bei der Fe(III)-Reduktion eine größere Rolle. In diesen Restseen konnte in MPN-Bestimmungen von neutrophilen Acetat verwertenden Fe(III)-Reduzierern Zellzahlen mit bis zu 10^5 Zellen cm^{-3} in Restsee 111 und bis zu 10^4 Zellen cm^{-3} in Restsee B bestimmt werden (MEIER 2001, WENDT-POTTHOFF UND MEIER 2000). So wurden auch aus moderat sauren Seesedimenten (pH 5,8-6,4) Fe(III)-reduzierende Bakterien, welche phylogenetisch der *Geobacter*-Gruppe zugeordnet werden müssen, isoliert werden. Es handelt sich bei diesen Isolaten um das neutrophile *Ferribacterium limneticum* sowie um ein nicht weiter beschriebenes Isolat *Geobacter* CdA-2 (CUMMINGS ET AL. 1999 & 2000).

Untersuchungen zur Fe(III)-reduzierenden Mikrobiota in mit Uran(VI) kontaminierten sauren Sedimenten ergaben, dass in pH-neutralen Anreicherungskulturen Vertreter der *Geobacter* eine dominierende Rolle einnahmen. Wurden die Anreicherungen jedoch unter in situ pH-Bedingungen (pH 4-5) durchgeführt, konnten keine *Geobacter*-Sequenzen erhalten werden. Unter diesen Bedingungen dominierten Klonsequenzen aus den Gruppen *Burkholderia*, *Pseudomonas* und *Pantoea* die Anreicherungskulturen (PETRIE ET AL. 2003).

4.2.3 Sulfatreduzierende Bakterien

Zur Eisen(III)-Reduktion sind einige sulfatreduzierende Bakterien aus der Gattung *Desulfovibrio* befähigt. Diese sind jedoch häufig nicht in der Lage, aus diesem Prozess Energie zu gewinnen (COLEMAN ET AL. 1993, LOVLEY 1995). Andere, wie z.B. *Desulfotomaculum reducens*, sind hingegen in der Lage mit Fe(III), Mn(IV), U(VI) oder Cr(VI) als Elektronenakzeptor zu wachsen (TEBO UND OBSTRAZTSOVA 1998). Aus den sauren Restseen sind bisher erst wenige Sulfatreduzierer isoliert worden (MEIER 2001, KÜSEL PERS. MITTEILUNG). Eine Fe(III)-Reduktion durch diese Isolate wurde bisher nicht beschrieben. Insgesamt liefern die Ergebnisse keinen Hinweis dafür, dass die sulfatreduzierenden Bakterien maßgeblich an der direkten Eisen(III)-Reduktion im Sedimenten von Restsee 77 beteiligt sind.

Eine Änderung in der Zusammensetzung der sulfatreduzierenden Mikrobiota konnte mit der angewendeten PhyloChip-Methode nicht ermittelt werden. Es kam mit zunehmender Sedimenttiefe zwar zu einer Zunahme in den Signalen der spezifischeren Sonden, eine

signifikante Änderung im Signalmuster konnte jedoch nicht beobachtet werden. Insgesamt wies das Signalmuster des PhyloChip große Ähnlichkeiten zum Signalmuster in Untersuchungen zur sulfatreduzierenden Mikrobiota in sauren Mooren auf (LOY ET AL. 2003). Die sulfatreduzierenden Populationen dieser zwei sauren Standorte scheinen in ihrer Zusammensetzung Gemeinsamkeiten aufzuweisen.

Die spezifische Sonde SYBAC587b für *Syntrophobacter wolinii* gab erst in Zone III ein positives Signal, während die hierarchisch übergeordneten Sonden wie DSBAC355 oder DELTA495a schon in den Zonen I oder II ein positives Signal ergaben. *S. wolinii* oder Verwandte Arten scheinen auf Zone III beschränkt zu sein. Ergänzend hierzu wurden in der Klonbibliothek mit dem Primerpaar GM3/Geo825R verwandte Klonsequenzen zu *S. wolinii* und der Klonsequenz K-4b1 erhalten. *S. wolinii* ist ein syntropher Organismus, der Propionat zu Acetat und CO₂ oxidiert. Die hierbei gebildeten Elektronen werden über Wasserstoff und/oder Formiat zu methanogenen Bakterien transferiert, welche Methan durch die Reduktion von CO₂ bilden. Diese Reaktion ist nur dann exergonisch, wenn der Wasserstoff und/oder das Formiat kontinuierlich entfernt wird. Allerdings ist die syntrophe Lebensweise nicht obligat, da *S. wolinii* mittels einer dissimilatorische Sulfatreduktion zu langsamem Wachstum befähigt ist (WALLRABENSTEIN ET AL. 1994). Bei Klon K-4b1 handelt es sich wahrscheinlich um einen syntrophen Organismus aus einem säuretoleranten methanogenen Konsortium (SIZOVA ET AL. 2003). Ob es sich bei den erhaltenen Sequenzen aus der Klonbibliothek (GM3/Geo825R) um syntrophe Organismen handelt, bei denen die Stoffwechselprodukte durch andere Organismen an eine Sulfat- oder Fe(III)-Reduktion gekoppelt werden, kann nur spekuliert werden. Zum einen liegen hierfür nicht genügend Untersuchungen vor. Zum anderen ist nicht bekannt, welche organischen Verbindungen den Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

Neben dem sauren pH-Wert stellt die Konkurrenz um die Verfügbarkeit der vorliegenden organischen Verbindungen sowie der höhere Energiebetrag aus der Fe(III)-Reduktion einen zusätzlich limitierenden Faktor für die Sulfatreduzierer dar. Die Eisen(III)-Reduktion kann durch den Verbrauch der wenigen organischen Substrate zur Limitierung der Sulfatreduktion beitragen. Zudem ist die Fe(III)-Reduktion thermodynamisch gegenüber der Sulfatreduktion begünstigt und kann soweit führen, dass eine komplette Inhibierung der Sulfatreduktion eintritt (CHAPELLE UND LOVLEY 1992). Dennoch fand im Sediment von Restsee 77 eine simultane Sulfat- und Eisenreduktion in tieferen Sedimentschichten statt (PEINE 1998, PEINE ET AL. 2000). Gleiches wurde in den Sedimenten der Restseen 111 B beobachtet (WENDT-POTTHOFF UND MEIER 2000).

4.2.4 Einfluss molekularbiologischer Methoden auf die Ergebnisse bei Diversitätsuntersuchungen

Bei fast allen Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität mittels molekularbiologischer Methoden steht die Extraktion der DNA aus den Umweltproben am Anfang. Damit die extrahierte DNA in ihrer 16S rDNA-Zusammensetzung die in den zu untersuchenden Proben vorhandene Diversität repräsentiert, muss ein möglichst kompletter Ausschluss aller Mikroorganismen erfolgen. Der Aufbau der Zellhülle unterscheidet sich bei den verschiedenen Organismengruppen. Gram-positive Bakterien sind im Besitz eines dicken und mehrschichtigen Mureinsacculus, während dieser bei den gram-negativen Bakterien nur aus 1 bis 2 Mureinschichten besteht. Die Zerstörung des Mureinsacculus bedarf daher bei den gram-negativen Bakterien rauerer Behandlungsmethoden. Extreme DNA-Extraktionsbedingungen können jedoch problematisch sein, da sie zu einer starken Fragmentierung der DNA führen, was eine Artefaktbildung während der Amplifikation der 16S rDNA begünstigt (VON WINTZINGERRODE ET AL. 1997).

Eine weitere Artefaktbildung besteht bei der Amplifizierung der 16S rDNA durch die PCR. Die sich ergebene Produktmenge ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Hierzu zählt neben der Wahl der Primer und der Zyklenzahl auch die Genomgröße, sowie die Anzahl der 16S rRNA-Gene in einer Zelle (FARRELLY ET AL. 1995, SUZUKI UND GIOVANNONI 1996). Des weiteren wird angenommen, dass nicht alle 16S rDNA Sequenzen eines PCR-Produktes mit einer vergleichbaren Effizienz in den Klonierungsvektor eingebaut werden (VON WINTZINGERRODE ET AL. 1997, LUEDERS UND FRIEDRICH 2000). Durch diese methodischen Fehler kann es somit zu einem verzerrten Bild der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften kommen.

Fingerprinting-Methoden wie z.B. die DGGE sind geeignete Methoden, um Veränderungen innerhalb einer Populationsstruktur zu detektieren, da sich dies in einem veränderten DGGE-Bandenmuster widerspiegelt (ENGELEN ET AL. 1998, LUKOV ET AL. 2000). Allerdings zeigen die 16S rDNA-Fragmente von unterschiedlichen Mikroorganismen nicht immer ein unterschiedliches Laufverhalten. So kann einer einzelnen DGGE-Bande (oder einer T-RFLP-Bande) nicht zwingenderweise eine einzelne 16S rDNA Sequenz und somit eine einzelne Bakterien-Spezies zugeordnet werden (ENGELEN ET AL. 1998, CHIN ET AL. 1999). Werden einzelne Banden eines DGGE-Gels ausgeschnitten und das enthaltene 16S rDNA-Fragment für eine direkte Amplifizierung und Sequenzierung verwendet, besteht daher immer die Gefahr, eine Mischung verschiedener 16S rDNA-Fragmente zu sequenzieren.

4.3 Mikrobielle Fe(III)-Reduktion durch azidophile Bakterien

4.3.1 Einfluss von pH und Fe(III)-Form auf die Fe(III)-Reduktion

Der Effekt des pH-Wert auf die Fe(III)-Reduktion konnte auch in den Untersuchungen an den Reinkulturen von *A. ferrooxidans* und *A. capsulatum* beobachtet werden. Die azidophilen Bakterien *A. ferrooxidans* und *A. capsulatum* konnten Fe(III) in einem pH-Bereich von 1,8 bis 5 reduzieren, wobei die ermittelten $\text{Fe(III)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten in Abhängigkeit vom pH und der verwendeten Fe(III)-Form variierten. *A. ferrooxidans*, als Vertreter der autotrophen azidophilen Fe(III)-Reduzierer, hatte seine optimale $\text{Fe(III)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsrate bei pH 1,8. Bei höheren pH-Werten (>3) war die Fähigkeit der Fe(III)-Reduktion mit mineralischen Fe(III)-Quellen vernachlässigbar. Für *A. ferrooxidans* ist unter aeroben Bedingungen ein Wachstum in einem pH-Bereich von pH 1,3 bis 5 beschrieben (BERGEY'S MANUAL 1989). Somit scheint der pH-Wert nicht der alleinig begrenzende Faktor für die geringe Fähigkeit von *A. ferrooxidans* zu sein, Fe(III) unter pH-Bedingungen von 4,5-5 zu reduzieren. Eine weitere Rolle spielt auch die verwendete Form des Fe(III). Die höchsten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten konnten mit *A. ferrooxidans* aus den schwach kristallinen Fe(III)-Oxiden erzielt werden. Aus Goethit erfolgte nur bei pH 3 eine nennenswerte $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung. Wie groß der Einfluss der Kristallinität der Fe(III)-Oxide ist, zeigte auch der Vergleich von Schwertmannit_{sterilf.} und Schwertmannit_{autokl.}. Durch das Autoklavieren kam es zu einer teilweisen Umwandlung des schwach kristallinen Schwertmannit zu dem stärker kristallinen Goethit (REGENSPURG 2002), was die höheren $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzungsraten aus Schwertmannit_{sterilf.} erklärt.

Die abnehmende mikrobielle Reduzierbarkeit von Fe(III)-Oxiden mit zunehmender Kristallinität und abnehmender Oberfläche wurde mehrfach in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt (MUNCH UND OTTOW 1980, RODEN UND ZACHARA 1996). So kommt es mit *Acidiphilium* SJH zu einer Abnahme der spezifischen reduktiven Auflösung von amorphem Fe(OH)_3 über Goethit und Natrojarosit zu Jarosit (BRIDGE UND JOHNSON 2000). Schwertmannit ist ein Fe-Mineral von schwacher Kristallinität, großer Oberfläche und geringer Stabilität (BIGHAM ET AL. 1996). Daher erscheint Schwertmannit besser reduzierbar zu sein als andere Fe(III)-Oxyhydroxysulfate, was die höhere Fe(III)-Reduktionsraten in Zone I erklärt.

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von pH und Fe(III)-Oxiden liegen auch für *A. cryptum* JF-5 und *A. cryptum*^T vor (ROTH 2000). Für beide liegt das pH-Optimum für die Fe(III)-Reduktion zwischen 2,5 und 3. Beide Stämme sind, im Gegensatz zu *A. ferrooxidans*, in der Lage, Schwertmannit auch bei pH 5 zu reduzieren. Das im Vergleich zu *A. ferrooxidans* weitere pH-Spektrum, in dem eine Fe(III)-Reduktion möglich ist, ist dem pH-Spektrum für das aerobe Wachstum ähnlich. Dies liegt für *A. cryptum*^T zwischen 2,0 und 5,2 (HARRISON

1984) und zwischen 1,9 und 5,9 für *A. cryptum* JF-5 (KÜSEL ET AL. 1999). Die für *A. cryptum*^T ermittelten Fe(III)-Reduktionsraten lagen um den Faktor 2,5 bis 4,7 unter den von *A. cryptum* JF-5. Alle bisher getesteten *Acidiphilium* Stämme können Fe(III) reduzieren, wobei die Fe(III)-Reduktion bei manchen Stämmen in Gegenwart von Sauerstoff schneller abläuft (JOHNSON UND MCGINNES 1991, HALLBERG UND JOHNSON 2001) mit Ausnahme von *A. cryptum* JF-5 (KÜSEL ET AL. 2002). So kann *Acidiphilium* SJH Fe(III) unter oxischen, nicht aber unter anoxischen Bedingungen reduzieren (JOHNSON UND BRIDGE 2002). Die an diesem Stamm ermittelten Fe(III)-Reduktionsraten waren unbeeinflusst vom Sauerstoffgehalt des Mediums, was dahingehend gedeutet wurde, dass die für die Fe(III)-Reduktion verantwortlichen Enzyme konstitutiv vorhanden sind. Andere *Acidiphilium* Spezies wie *A. acidophilum* bevorzugen mikroaerophile Bedingungen und synthetisieren die für die Fe(III)-Reduktion notwendigen Enzyme nur unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (JOHNSON UND BRIDGE 2002). Die in *A. cryptum* JF-5 für die Fe(III)-Reduktion verantwortlichen Enzyme werden auch in Gegenwart hoher Sauerstoffkonzentrationen synthetisiert, jedoch nur in Gegenwart von Fe(III) (KÜSEL ET AL. 2002). Diese Unterschiede in der Regulation der Enzymsysteme sind möglicherweise die Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Fe(III)-Reduktionsrate von *A. cryptum* JF-5 und *A. cryptum*^T.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass *A. ferrooxidans* in seiner Aktivität im anoxischen Sediment saurer Restseen auf den oberen sauren Bereich beschränkt zu sein scheint, während für *A. cryptum* JF5 auch ein Beitrag zur Fe(III)-Reduktion in den Sedimentzonen mit höherem pH-Wert in den tieferen Sedimentschichten angenommen werden kann. Diese Annahme lässt sich auch durch die geringen MPN Ergebnissen ($2,1-5 \times 10^2$) für Schwefel oxidierende Fe(III)-Reduzierer in Zone I und Zone III unter pH 5 Bedingungen unterstützen (ROTH 2000).

Trotz der bei pH 4 oder 5 vernachlässigbaren Fähigkeit zur Fe(III)-Reduktion von *Acidiphilium* und *Acidithiobacillus* kommt es zu einer Steigerung der Fe(II)_{ges.}-Freisetzung nach einer lag-Phase von 2 Tagen in Zone I, wenn hier der pH von in situ 2,9 auf 5,2 eingestellt wurde. Ähnliche Befunden zeigten sich dann, wenn der pH-Wert der Zone I auf 4 bzw. 4,8 eingestellt wurde (ROTH 2000). Die MPN-Zahl der Fe(III)-reduzierenden Mikroorganismen aus Zone I unter pH 5 Bedingungen war nur sehr gering (ROTH 2000). Nichtsdestoweniger weist die beobachtete lag-Phase vor dem Einsetzen der Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in den Mikrokosmen auf eine Änderung in der Fe(III)-reduzierenden Mikrobiota in Zone I unter pH 5 Bedingungen hin, die anscheinend mit den verwendeten Kultivierungsansätzen (ROTH 2000) nicht erfasst wurden. Bei höheren pH-Werten kommt es zu einer Umwandlung von Schwertmannit in Goethit. Hiermit einhergehend verschiebt sich

die Oberflächenladung zu verstärkt negativeren Werten, was zu einer Freisetzung von adsorbiertem organischen Material von den Fe-Mineralen führt (LASKOV ET AL. 2002). Diese Freisetzung von organischem Material durch die künstliche pH-Erhöhung könnte als Elektronendonator für die stimulierte Fe(III)-Reduktion verantwortlich sein. Hiefür sprechen die Befunde, dass die Fe(III)-Reduktion in Mikrokosmen der Zone I und Zone III durch die Zugabe einer Huminstoff-Lösung stimuliert werden konnte.

4.3.2 Limitierung der Fe(III)-Reduktion

Bei der Verwendung von Fe(III) in Form unlöslicher Minerale, wurden weniger als 20% des angebotenen Fe(III) zu Fe(II) reduziert. In den Reinkulturexperimenten mit *A. ferrooxidans* und den unterschiedlichen Fe(III)-Mineralen wurden maximal ca. 4 mM Fe(II) aus den 40 mM Schwertmannit freigesetzt, was circa 10% entsprach. Im Vergleich hierzu wurde bei der Verwendung von löslichen Fe(III)-Quellen das Fe(III) nahezu vollständig zu Fe(II) reduziert. Es kommt bei den Fe(III)-Mineralen zu einer Einstellung der mikrobiellen Reduktion. Durch die Sorption von Fe(II) auf den Fe(III)-Oxiden bildet sich eine oberflächliche Schicht, die eine weitere Reduktion inhibiert (RODEN UND ZACHARA 1996, COUGHLIN UND STONE 1995, RODEN ET AL. 2000, LIU ET AL. 2001). Da die Löslichkeit von Fe(II) mit steigendem pH-Wert abnimmt, kommt es zu einer gesteigerten Sorption von Fe(II)-Ionen auf den Fe(III)-Oxiden unter pH 5 Bedingungen. Dies kann zu einer zusätzlichen Inhibierung der Fe(III)-Reduktion führen.

In einer Vielzahl von Untersuchungen wurde eine unvollständige Reduktion der verwendeten Fe(III)-Minerale sowie ein Rückgang der Fe(III)-Reduktionsraten beobachtet (LOVLEY UND PHILLIPS 1986A UND 1986B, RODEN UND ZACHARA 1996, URRUTIA ET AL. 1998, RODEN UND URRUTIA 1999). Genauere Untersuchungen ergaben für die initiale Fe(III)-Reduktion eine Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Oberfläche der verwendeten Fe(III)-Minerale (RODEN UND ZACHARA 1996). Neben der Sorption von Fe(II) auf Fe(III)-Mineraloberflächen kann auch die Sorption auf den Zelloberflächen eine entscheidende Rolle bei der Einschränkung der Fe(III)-Reduktion spielen, wie dies z.B. durch Untersuchungen an *Shewanella alga* gezeigt wurde (URRUTIA ET AL. 1998).

4.4 Huminstoffe als Elektronendonator für die reduktiven Prozesse im Sediment

Jüngste Untersuchungen ergaben für Acetat oder Laktat, typische Elektronendonoren für neutrophile Fe(III)-reduzierende Bakterien (LOVLEY 1993, NEALSON UND MYERS 1992, CUMMINGS ET AL. 1999), keine stimulierende Wirkung auf die Fe(III)-Reduktion im Sediment von Restsee 77. Wie bereits unter 4.2.2 erwähnt, gehen einige Autoren (KÜSEL UND DORSCH 2000)

daher davon aus, dass die Fe(III)-Reduktion in sauren Restseen an die Oxidation von komplexeren organischen Verbindungen gekoppelt ist. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Anreicherungskulturen (MBH_{ZIII} und MBH_{ZIV}) erhalten werden, die unter der Verwendung einer Huminstoff-Lösung zur Fe(III)-Reduktion befähigt waren. Aus diesen Anreicherungskulturen konnten mit KF1, KF2 und KF3 drei Isolate gewonnen werden. Diese Fähigkeit zeigte sich in der Auflösung der Fe(III)-Minerale im Agar (Hofbildung, siehe 3.14).

Die aus dem Sediment von Restsee 77 extrahierten Huminstoffe aus Zone I und Zone III konnten zur Stimulierung der Fe(III)-Reduktion eingesetzt werden. Es handelt sich bei dieser Huminstoff-Lösung um eine Lösung mit komplexer Zusammensetzung. Eine photochemische Reduktion, wie sie in der Literatur beschrieben wird (COLLIENNE 1983), konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Allerdings kann über die an diesem Prozess beteiligten Mikroorganismen nichts gesagt werden, da weder aus den Anreicherungskulturen, noch aus den Isolaten eine amplifizierbare DNA extrahiert werden konnte.

Die Untersuchung zum organischen Kohlenstoff im Sediment von Restseen 77 ergab, dass dieser sich überwiegend (50-90%) aus Braunkohle bzw. aus deren Verwitterungsprodukten zusammensetzt, der Rest besteht aus terrigenem (10-30%) bzw. aus aquagenem Material (0-30%) (NOHLEN 1999). Vor allem die hohen DOC-Konzentrationen im Porenwasser, die im Restsee 77 bei 0,1-0,3 mmol⁻¹ lagen (NOHLEN 1999), lassen sich auf Kohleverwitterungsprodukte zurückzuführen, welche hauptsächlich aus aromatischen Polycarbonsäuren bestehen (BLODAU ET AL. 1998, FRIESE ET AL. 1998, NOHLEN 1999). In Untersuchungen an den Restseen 77 und 116 konnte nur eine geringe negative Korrelation zwischen der gesamten Kohlenstoff-Oxidationsrate und den im Porenwasser vorkommenden DOC-Konzentrationen festgestellt werden (BLODAU ET AL. 2000). Die Autoren folgerten daraus, dass der DOC nicht als Kohlenstoff- oder Energiequelle durch die Eisen(III)- oder sulfatreduzierenden Bakterien genutzt wird. Der aquagene organische Kohlenstoff (AOC), der mit 5% nur einen geringen Anteil am Gesamtkohlenstoff ausmacht, trägt mit bis zu 56% zur gesamten Kohlenstoffoxidation bei (BLODAU ET AL. 2000). Jedoch ist aufgrund der geringen Primärproduktion in den sauren Restseen die autochthone Bildung dieser leicht abbaubaren Kohlenstoffquelle limitiert.

Für Mikroorganismen stellt Braunkohle keine geeignete Kohlenstoffquelle dar, da sie durch ihre hochpolymere Struktur sowie ihrer hohen Hydrophobizität nur von wenigen Mikroorganismen (z.B. Basidiomyceten) abgebaut wird. Über den anoxischen Abbau von Braunkohle ist nur sehr wenig bekannt (FAKOUSSA UND HOFRICHTER 1999). Der Abbau von Braunkohle durch Mikroorganismen ist mehrfach in Laborexperimenten demonstriert worden (WILLMANN UND FAKOUSSA 1997, WASCHKIES UND HÜTTL 1999). Es konnte gezeigt werden, dass

der Abbau von Braunkohle über unspezifische extrazelluläre Reaktionen verläuft, ähnlich dem Abbau von Lignin durch oxidative oder hydrolytische Enzyme, alkalische Metabolite und natürliche Chelatoren (FAKOUSSA UND HOFRICHTER 1999). Es wird allgemein angenommen, dass der mikrobielle Abbau von Braunkohle einen Co-Metabolismus darstellt und wie von Lignin bekannt, von Mikroorganismen nicht als Kohlenstoffquelle verwendet wird. Einige Autoren betonen jedoch, dass die Lausitzer Braunkohle sich in einem sehr frühen Stadium der Kohlefikation befindet und die Aufnahme von NMR-Spektren Hinweise auf das Vorkommen von Polysacchariden ergeben, welche durchaus mikrobiell verfügbar sind (RUMPEL UND KÖGEL-KNABNER 2002). Wie die Analyse der Huminstoff-Lösungen zeigte, konnte in den Huminstoff-Lösungen aus den Zonen I und III Polysaccharide nachgewiesen werden. Ob jedoch die Fe(III)-Reduktion an den Abbau dieser Verbindungen gekoppelt war, kann nicht positiv beantwortet werden. Hier sind weitere Untersuchungen nötig.

4.5 Kopplung des Schwefels und Eisenkreislaufs im Sediment

Durch die Zugabe von Acetat, eine von sulfatreduzierenden Bakterien häufig verwendete Kohlenstoff- und Energiequellen (WIDDEL UND BAK 1992), konnte die Sulfatreduktion in Mikrokosmen der Zone III stimuliert werden. Die Stimulierung lässt auf eine Substratlimitierung der Sulfatreduktion bezüglich der Kohlenstoffquellen und Elektronendonoren schließen. Da ein Nachweis von Sulfid als Endprodukt der Sulfatreduktion im Sediment nicht möglich war, konnte nur indirekt durch die Konzentrationsabnahme von Sulfat auf eine stattfindende Sulfatreduktion geschlossen werden. Gleichzeitig konnte eine Abnahme im $\text{Fe(II)}_{\text{löslich}}$ beobachtet werden. Zusätzlich trat eine leichte schwärzliche Verfärbung des Sediments auf, was auf die Bildung von Eisensulfiden schließen ließ. Neben diesen Eisensulfiden, die als AVS bestimmt wurden, konnte eine Bildung von elementarem Schwefel beobachtet werden; der Nachweis einer nennenswerten Pyritbildung gelang hingegen nicht.

Die Bildung von elementarem Schwefel als Reaktionsprodukt aus dem Sulfid der Sulfatreduktion und den Eisenmineralen konnte durch Teilergebnisse aus dem geochemischen Teilprojekt bestätigt werden (GADE 2003). Die Reaktionen verliefen stark pH-abhängig, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkendem pH-Wert abnahm. Die Reaktionskonstanten zeigten eine Abhängigkeit von der Oberflächenazidität und nicht wie erwartet von der spezifischen Oberfläche der untersuchten Fe(III)-Minerale (GADE 2003). Entscheidend für die Reaktionskinetik war die Dichte und Anordnung der oberflächenständigen OH-Gruppen auf den Eisenhydroxiden. Die Dichte der OH-Gruppen steigt mit zunehmender Kristallinität an. Allerdings konnte eine vollständige Inhibierung der

Reaktion von Eisenhydroxiden mit Sulfid durch die Anwesenheit von Sulfat (5 mM) erzielt werden, da das Sulfat an den oberflächenständigen OH-Gruppen des Fe(III) sorbiert, die Reaktionsplätze für das Sulfid somit belegt sind und eine weitere Reaktion mit Sulfid nicht mehr möglich ist (GADE 2003).

Die gleichen Ergebnisse, die an den synthetischen Fe(III)-Mineralen erzielt wurden, konnten bei der Verwendung von Sedimentmaterial erhalten werden. Auch hier zeigte sich nur ein sehr geringer Umsatz des Sulfids. Dies war zu erwarten, da die hohen Sulfatgehalte im Porenwasser des Restsees 77 die potentiellen Reaktionsplätze des Sulfids durch Sorption belegen und dadurch eine Reaktion inhibieren (GADE 2003).

Auf den ersten Blick stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Befunden in der vorliegenden Arbeit, da in Mikrokosmenexperimenten elementarer Schwefel als Reaktionsprodukt der chemischen Reaktion des Sulfids aus der Sulfatreduktion mit den Fe(III)-Mineralen nachgewiesen wurde (siehe 3.17). Ein Großteil der in Sedimenten vorkommenden Mikroorganismen ist mit den Sedimentpartikeln assoziiert (RAVENSCHLAG ET AL. 2001). Die Mikroorganismen stehen somit in einem direkten Kontakt mit der Oberfläche. Es kann daher angenommen werden, dass sie in diesem Kontaktbereich einen Einfluss auf die Protonierung und damit auch einen Einfluss auf die Reaktion von Sulfid mit den oberflächlichen OH-Gruppen nehmen können. Wie wichtig ein direkter Kontakt für Mikroorganismen sein kann, zeigen neueste Untersuchungen zur Auflösung von Pyrit durch *A. ferrooxidans* (SAND ET AL. 2001). Durch die Bildung extrazellulärer Polysaccharide (EPS) wird eine Anheftung und Ausbildung eines Biofilms ermöglicht. Im EPS werden Fe(III)-Ionen durch Glucuronsäure komplexiert, über die ein chemischer Angriff (siehe Gl. 1-3) auf die Metallsulfide erfolgt. Der Organismus regeneriert fortlaufend das verbrauchte Fe(III). Durch diese Regenerierung sowie die Komplexbildung im EPS erfolgt eine Konzentrierung von Fe(III) an der Oberfläche der Metallsulfide, was eine chemische Reaktion zur Folge hat.

Übertragen auf das saure Sediment von Restsee 77 kann daraus geschlossen werden, dass die postulierte initiale Reaktion des Sulfids aus der Sulfatreduktion mit den im Überschuss vorhandenen Fe(III)-Mineralen zu elementarem Schwefel im Sediment abläuft, diese Reaktion aufgrund der hohen Sulfatwerte aber wahrscheinlich nicht die Hauptrolle spielt. Das Sulfid liegt daher zum Teil auch noch als H_2S vor, und steht somit einer mikrobiell vermittelten Oxidation zur Verfügung. Eine Vielzahl von chemotrophen (KELLY ET AL. 1997) und phototrophen Bakterien (BRUNE 1995) ist unter anoxischen Bedingungen zu einer Sulfidoxidation befähigt. Die Elektronen aus dem Sulfid können an zwei Stellen der Elektronentransportkette eingespeist werden. Die Einspeisung der Elektronen von Sulfid auf der Ebene des Chinon-Pools durch die SQR wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht und stellt wahrscheinlich ein evolutionär altes Enzym dar. Eine Enzymaktivität

bzw. das hier die SQR codierende Gen wurde bei einer Reihe von Bakterien nachgewiesen. Die weite Verbreitung innerhalb der Prokaryonten lässt auf eine frühe Entstehung in der Evolution schließen (GRIESBECK ET AL. 2000). Ein Nachweis für die SQR erfolgte nicht ausschließlich innerhalb der Prokaryonten, auch bei Eukaryonten aus den Gruppen der Anneliden, Mollusken oder Vertebraten gelang ein Nachweis der Kopplung der ATP-Synthese an die Oxidation von Sulfid (GRIESHABER UND VÖLKELE 1998, PARRINO ET AL. 2000). Gene mit hoher Homologie zur SQR wurden auch bei *Shewanella putrefaciens* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* entdeckt (NÜBEL ET AL. 2000).

4.6 Kopplung des Schwefelkreislaufs an den Eisenkreislauf

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die Kopplung des Schwefel- und Eisenkreislaufes ausgehend vom elementaren Schwefel erfolgt. Allerdings konnte eine Stimulierung der Fe(III)-Reduktion im Sediment durch die Zugabe von elementarem Schwefel nur in Zone I beobachtet werden. Bei der stimulierten Fe(III)-Reduktion wurde mehr Sulfat freigesetzt, als aufgrund des Verhältnisses von elementarem Schwefel zu Fe(III) (1:8) zu erwarten gewesen wäre. Die zusätzlichen 4,9 mM stammen aus der reduktiven Auflösung von Schwertmannit. In Zone III konnte aufgrund der großen Standardabweichungen ein möglicher stimulierender Effekt nicht beobachtet werden. Hier wäre aufgrund der geringen MPN-Ergebnisse ($2,1 \times 10^2$) für Schwefel oxidierende Fe(III)-Reduzierer (ROTH 2000) auch nur ein sehr geringer Effekt zu erwarten gewesen.

Hingegen konnte an den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 bzw. an dem Isolat MB3 zwei Prozesse aufgezeigt werden, die eine Kopplung des Schwefelkreislaufs an den Eisenkreislauf im Sediment ermöglichen. Die Kopplung der beiden Kreisläufe geht sowohl in den Anreicherungskulturen als auch im Isolat vom elementarem Schwefel aus.

In den Anreicherungskulturen MB1 und MB2 kam es zu einer im Vergleich zu inokulierten und chemischen Kontrollen erhöhten $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung über eine Zeitspanne von 470 Tagen. Eine kontinuierliche $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Freisetzung mit einer Freisetzungsrates von ca. $45\text{--}70 \mu\text{mol l}^{-1}\text{d}^{-1}$ konnte auch in den Folgetransfers beobachtet werden.

Die in MB2 gemessene Oxidation von 1,31 mM elementarem Schwefel (Reaktionsprodukt aus der chemischen Reaktion von Na_2S mit Fe(III)) führte zu einer Zunahme in der $\text{Fe(II)}_{\text{ges.}}$ -Konzentration um 7,11 mM. Dies entspricht einem Verhältnis von Fe(II) zu elementarem Schwefel von 1:5,5, was nahe am theoretischen Wert von 1:6 liegt. Da hier auch keine Zunahme im AVS-Pool gemessen wurde, was für eine Disproportionierung sprechen würde, kann auf eine Oxidation von elementarem Schwefel zu Sulfat gekoppelt an die Reduktion von

Fe(III) geschlossen werden. Die aus Anreicherungskultur MB2 erhaltenen Klonsequenzen gehörten z.B. zu den Acidobacteria oder den Nitrospira. Diese Gruppen konnten auch in Zone I und III wiedergefunden werden. Dies unterstützt die Annahme, dass die in den Anreicherungen ablaufenden Prozesse *in situ* eine gewisse Relevanz besitzen.

Eine Disproportionierung als Kopplungsprozess konnte hingegen am Isolat MB3 aufgezeigt werden. MB3 konnte kontinuierlich in Mineralmedium mit elementarem Schwefel als Energiequelle und Fe(III)-Mineral als chemischem Sulfidfänger unter autotrophen Bedingungen kultiviert werden. Organische Substrate oder Vitamine waren für das Wachstum nicht notwendig. MB3 zeigte ausschließlich ein Wachstum durch eine Disproportionierung von elementarem Schwefel und Thiosulfat. Sowohl bei Thiosulfat als auch bei elementarem Schwefel war die Gegenwart von Fe(III) im Medium für ein Wachstum notwendig. Eine Sulfatreduktion oder ein fermentativer Stoffwechsel mit Pyruvat wurden nicht beobachtet. Damit ähnelt MB3 in seiner Physiologie *Desulfocapsa sulfoexigens*, der bisher als einziger autotroph wachsender Schwefeldisproportionierer beschrieben wurde (FINSTER ET AL. 1998). Ein Vergleich des Wachstums bei unterschiedlichen pH- und Temperaturwerten zeigt für MB3 eine Anpassung an die Bedingungen im sauren Sediment von Restsee 77. Eine Disproportionierung durch MB3 konnte nur in einem sehr engen pH-Spektrum von 5-6,5 ermittelt werden, wobei das Optimum bei 5,5-6 lag. Auch die optimale Wachstumstemperatur zeigt eine Anpassung an den Standort. MB3 zeigte ein optimales Wachstum im Bereich von 15-20°C. *D. sulfoexigens*, als mariner Vertreter, disproportioniert bei pH-Werten von 6-8,2 und hat ein optimales Wachstum bei 30°C. Für MB3 ist die Disproportionierung ebenso obligat wie für *D. sulfoexigens*, womit sich die beiden grundsätzlich von *Desulfocapsa thiozymogenes* (JANSSEN ET AL. 1996) bzw. von marinen Anreicherungskulturen (THAMDRUP ET AL. 1993) unterscheiden; diese benötigen für ihr Wachstum zusätzlich organischen Kohlenstoff.

Beim Isolat MB3 konnten Hinweise für eine Intoleranz gegenüber höheren Sulfidkonzentrationen gefunden werden, da ohne einen chemischen Sulfidfänger im Medium nur eine relativ geringe Akkumulation von Sulfid bei der Disproportionierung von elementarem Schwefel oder Thiosulfat erfolgte. In den Untersuchungen an MB3 ohne Fe(III) als Sulfidfänger kam es zu einer maximalen Sulfidakkumulation von 120 µM. Im Vergleich hierzu sind für *D. sulfoexigens* und *D. thiozymogenes* ohne Sulfidfänger Sulfidkonzentrationen von 2-3 mM beschrieben (FINSTER ET AL. 1998, JANSSEN ET AL. 1996). Diese Intoleranz gegenüber höheren Sulfidkonzentrationen lässt sich auf den sauren pH zurückführen. Unter sauren pH-Werten ist die Toxizität des Schwefelwasserstoffs dadurch begründet, dass bei pH-Werten unter pH 6 das freie Sulfid nahezu vollständig als Schwefelwasserstoff vorliegt. Dieser kann die Zellmembran ungehindert passieren und im

Zellinnern durch eine chemische Reaktion mit den Metallen in den katalytischen Zentren von Enzymen diese inaktivieren (REIS ET AL. 1992, O'FLAHERTY ET AL. 1998).

MB3 wurde aus Zone III des Sedimentes von Restsee 77 durch eine Verdünnungsreihe aus der 10^{-3} -Verdünnungsstufe isoliert. Damit liegt dieser Organismus in einer Größenordnung von 10^3 Zellen/g FG vor. Bei der Anreicherung von MB3 über eine Verdünnungsreihe wurde nur bis zur 10^{-3} -Verdünnungsstufe angeimpft. Deshalb besteht durchaus die Möglichkeit, dass dieser Organismus, bzw. der mit diesem Organismus verbundene Stoffwechseltyp der Disproportionierung, in noch weit höheren Zellzahlen im Sediment vorkommt. Andere Stoffwechseltypen konnten in der Zone III von Restsee 77 mit 10^3 Zellen/g FG für Glukose-verwertende Fe(III)-Reduzierer, 10^4 Zellen/g FG für allgemeine Anaerobier oder 10^2 Zellen/g FG elementaren Schwefel-verwertende Fe(III)-Reduzierer in der Zone III bestimmt werden (ROTH 2000). Die MPN für die Gruppe der Sulfatreduzierer ergab in unterschiedlichen sauren Restseen Werte zwischen 10^3 und 10^5 MPN/g FG (FORTIN ET AL. 1996, MEIER UND BABENZIEN 2000, KÜSEL ET AL. 2001). Ein Vergleich dieser Zahlen lässt den Schluss zu, dass die Schwefeldisproportionierung in der Zone III von Restsee 77 ein gleichwertiger Stoffwechselweg ist. Die phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Gensequenz weist MB3 als einen Vertreter der δ -Proteobakterien aus, wobei die größte phylogenetische Ähnlichkeit mit 99,5% zur Klonsequenz GOUTA17 besteht, die aus einem Versuchsreaktor zum Abbau von Chlorbenzol in kontaminierten Grundwässern isoliert wurde (ALFREIDER ET AL. 2002).

5 Literatur

- ALEF, K.** (1991) Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Ecomed Verlagsgesellschaft mgH, Landsberg/Lech.
- ALMENDROS, A., DORADO, J.** (1999) Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *European Journal of Soil Science* 50:227-236
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- ANDERSON, R.F., SCHIFF, S.L.** (1987) Alkalinity generation and the fate of sulfur in lake sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44:188-193.
- ATLAS, R.M., BARTHA, R.** (1993) *Microbial Ecology*. Benjamin Cummings, Redwood City, CA: S. 563.
- BAK F., CYPIONKA H.,** (1987) A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds. *Nature* 326:891-892
- BARTLETT, J.K., SKOOG, D.A.** (1954) Colorimetric determination of elemental sulfur. *Anal. Chem.* 26:1008-1011.
- BERNER, R.A.** (1984) Sedimentary pyrite formation: an update. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48:605-615.
- BIGHAM, J.M., SCHWERTMANN, U., CARLSON, L., MURAD, E.** (1990) A poorly crystallized oxyhydroxysulfate of iron formed by bacterial oxidation of Fe(II) in acid mine waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54:2743-2758.
- BIGHAM, J.M., SCHWERTMANN, U., PFAB, G.** (1996) Influence of pH on mineral speciation in a bioreactor simulating acid mine drainage. *Appl. Geochem.* 11:845-849.
- BIGHAM, J.M., SCHWERTMANN, U., TRAINA, S.J., WINLAND, R.L., WOLF, M.** (1996) Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60:2111-2121.
- BLODAU, C., PEINE, A., HOFFMANN, S. PEIFFER, S.** (2000) Organic matter diagenesis in acidic mine lakes. *A. Hydrochim. Hydrobiol.* 28:123-135.
- BOND, P.L., BANFIELD, J.F.** (2001) Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acidic mine drainage environments. *Microbial Ecology* 41:149-161.
- BOND, P.L., DRUSCHEL, G.K., BANFIELD, J.F.** (2000A) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4962-4978.
- BOND, P.L., SMRIGA, S.P., BANFIELD, J.F.** (2000B) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3842-3849.

- BOONE, D.R., BRYANT, M.P.** (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 40:626-632.
- BRETT, J.B., HUGENHOLTZ, P., DAWSON, S.C., BANFIELD, J.F.** (2003) Extremely Acidophilic Protists from Acid Mine Drainage Host *Richettsiales*-Lineage Endosymbionts That Have Intervening Sequences in Their 16S rRNA Genes. Appl. Environ. Microbiol. 69:5512-5518.
- BRIDGE, T.A.M., JOHNSON, D.B.** (1998) Reduction of soluble iron and reductive dissolution of ferric iron-containing minerals by moderately thermophilic iron-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64:2181-2186.
- BRIDGE, T.M., JOHNSON, D.B.** (2000) Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH. Geomicrob J. 17:193-206.
- BRINKMEYER, R., KNITTEL, K., JÜRGENS, J., WEYLAND, H., AMANN, R., HELMKE, E.** (2003) Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. Appl. Environ. Microbiol. 69:11 6610-6619.
- BROCK, T.D., GUSTAFSON, J.** (1976) Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 32:567-571.
- BROFFT J.E., VAUN MCARTHUR, J., SHIMKETS, L.J.** (2002) Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. Environm. Microbiol. 4:764-769.
- BROWN, M.V., BOWMAN, J.P.** (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). FEMS Microbiol. Ecol. 35:267-275.
- BRUNE, D.C.** (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E., Hrsg.). S. 847-870. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- CANFIELD, D.E., RAISWELL, R., BOTTRELL, S.** (1992) The reactivity of sedimentary iron minerals toward sulfide. Amer. J. Sci. 292:659-683.
- CHAPLE, F.H., LOVLEY, D.R.** (1992) Competitive exclusion of sulfate reduction by Fe(III)-reducing bacteria: a mechanism for producing discrete zones of high-iron ground water. Ground Water 30:29-36.
- CHIN, K.-J., LUKOW, T., CONRAD, R.** (1999) Effect of temperature on structure and funktion of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. Appl. Environ. Microbiol. 65:2341-2349.
- CHRISTENSEN, B.T.** (1992) Physical Fractionation of soil and soil organic matter in primary particle size and density separates. Adv. Soil Sci. 20:1-90.
- CLEMENT, B.G., KEHL, L.E., DEBORD, K.L., KITTS, C.L.** (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFLPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. J. Microbiol. Methods 31:135-142.
- COATES, J.D., PHILLIPS, E.J.P., LONERGAN, D.J., JENTER, H., LOVLEY, D.R.** (1996) Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. Appl. Environ. Microbiol. 62:1531-1536.

- COLEMAN, M.L., HEDRICK, D.B., LOVLEY, D.R., WHITE, D.C., PYE, K.** (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* 361:436-438.
- COLLIENNE, R.H.** (1983) Photoreduction of iron in the epilimnion of acidic lakes. *Limnol. Oceanogr.* 28:83-100.
- COOK, R.B., KELLY, C.A., SCHINDLER, D.W., TURNER, M.A.** (1986) Mechanisms of hydrogen ion neutralisation in an experimentally acidified lake. *Limnol. Oceanogr.* 31:134-148.
- CORNELL, R.M., SCHWERTMANN, U.** (1996) The iron oxides. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- COUGHLIN, B.R., STONE, A.T.** (1995) Nonreversible Adsorption of Divalent Metal Ions (MnII, CoII, NiII, CuII, and PbII) onto Goethite: Effects of Acidification, FeII Addition, and Picolinic acid Addition. *Environ. Sci. Technol.* 29:2445-2455.
- CUMMINGS, D.E., CACCAVO, JR. F., SPRING, S., ROSENZWEIG, R.F.** (1999) *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediment. *Arch Microbiol.* 171:183-188.
- CUMMINGS, D.E., MARCH, A.W., BOSTICK, B., SPRING, S., CACCAVO JR., F., FENDORF, S., ROSENZWEIG, R.F.** (2000) Evidence for microbial Fe(III) reduction in anoxic, mining-impacted lake sediments (Lake Coeur d'Alene, Idaho). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:154-162.
- DARWIN, C.R.** (1963) Die Entstehung der Arten durch natürliche Zuchtwahl. Reclam, Stuttgart (Orig. 1859).
- DAS, A., MISHRA, A.K.** (1996) Role of Thiobacillus ferrooxidans and sulphur (sulphide)-dependent ferric-iron-reducing activity in the oxidation of sulphide minerals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:377-382.
- DOJKA, M.A., HUGENHOLTZ, P., HAACK, S.K., PACE, N.R.** (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent- contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3869-3877.
- DOS SANTOS AFONSO, M., STUMM, W.** (1992) Reductive Dissolution of Iron(III) (Hydr)oxides by Hydrogen Sulfide. – *Langmuir.* 8:1671-1675.
- DROBNER, E., HUBER, H., WÄCHTERSCHÄUSER, G., ROSE, D., STETTER, K.O.** (1990) Pyrite formation linked with hydrogen evolution under anaerobic conditions. *Nature.* 346:742-744.
- DUNBAR, J., TICKNOR, L.O., KUSKE, C.R.** (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2943-2950.
- EDWARDS, K.J., GIHRING, T.M., BANFIELD, J.F.** (1999) Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3627-3632.
- EHRlich, H.L.** (1996) Geomicrobiology. 3. Aufl., Marcel Dekker, New York. S. 719.

- ENGELN, B., MEINKEN, K., VON WINTZINGERODE, F., HEUER, H., MALKOMES, H.-P., BACKHAUS, H.** (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2814-2821.
- FAKOUSSE, R.M., HOFRICHTER, M.** (1999) Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 52:25-40.
- FARRELLY, V., RAINEY, F.A., STACKEBRANDT, E.** (1995) Effect of genom size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2798-2801.
- FINSTER, K., LIESACK, W., THAMDRUP, B.** (1998) Elemental Sulfur and Thiosulfat Disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigens* sp. nov., a New Anaerobic Bacterium Isolated from Marine Surface Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:119-125.
- FORTIN, D., DAVIS, B., BEVERIDGE, T.J.** (1996) Role of Thiobacillus and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21:11-24.
- FREVERT, T.** (1983) Hydrochemisches Grundpraktikum. UTB Birkhäuser, Basel. S. 215.
- FRIESE, K., WENDT-POTTHOFF, K., ZACHMANN, D.W., FAUVILLE, A., MAYER, B., VEIZER, J.** (1998) Biogeochemistry of iron and sulfur in sediments of an acidic mining lake in Lusatia, Germany. *Water Air Soil Pollution* 108:231-247.
- FROSTEGÅRD, A., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., LE GALL, F., JEANNIN, P., NESME, X., SIMONET, P.** (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5409-5420.
- GADE, W.** (2003) Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth. - Kopplung der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen mit der Reduktion von Ferro(hydr)oxiden in anoxischen Sedimenten saurer Seen.
- GELLER, W., KLAPPER, H., SCHULTZE, M.** (1998) Natural and anthropogenic sulfuric acidification of lakes. In: Geller, W., Klapper, H., Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. *Environ. Sci. Series Springer*, Berlin: S. 3-14.
- GOEBEL, B.M., STACKEBRANDT, E.** (1994) Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1614-1621.
- GREENBERG, R.** (2002) Tides and the biosphere of Europa. *Am. Sci.* 90:48-55
- GRIESBECK, C., HAUSKA, G. UND SCHÜTZ, M.** (2000) Biological Sulfide Oxidation: Sulfide-Quinone-Reductase (SQR), the Primary Reaction. In: Recent Research Developments in Microbiology, Vol. 4 (Pandalai, S.G., Hrsg.). S. 179-203. Research Signpost, Trivandrum, India
- GRIESHABER, M.K. UND VÖLKEL, S.** (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.* 60:33-53.

- HALLBERG, K.B., JOHNSON, D.B.** (2001) Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv. Appl. Microbiol.* 49:37-84.
- HARRISON JR., A.P.** (1984) The acidophilic *Thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Ann. Rev. Microbiol.* 38:265-292.
- HARRISON, J.A.P.** (1985) The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:265-292.
- HEDGES, J.I., OADES, J.M.** (1997) Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Org. Geochem.* 27:319-361.
- HEDLUND, B., GOSINK, J.J., STALEY, J.T.** (1997) *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of Prostheco bacter. *Antonie Leeuwenhoek* 72:29-38.
- HERLIHY, A.T., MILLS, A.L., HORNBERGER, G.M., BRUCKNER, A.E.** (1987) The importance of sediment sulfate reduction to the sulfate budget of an impoundment receiving acid mine drainage. *Water Resources Research* 23:287-292.
- HERZSPRUNG, P., FRIESE, K., PACKROFF, G., SCHIMMELE, M., WENDT-POTTHOFF, K., WINKLER, M.** (1998) Vertical and annual distribution of ferric and ferrous iron in acidic mining lakes. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26(5):1-10.
- HIRAISHI, A., MATSUZAWA, Y., KANBE, T., WAKAO, N.** (2000) *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1539-1546.
- HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R.** (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.* 18:4765-4774.
- HURLBERT, S.H.** (1971) The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52:577-586.
- JANSSEN, P.H., SCHUHMANN, A., BAK, F., LIESACK, W.** (1996) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium *Desulfocapsa thiozymogenes* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 166:184-192.
- JANSSEN, P.H., YATES, P.S., GRINTON, B.E., TAYLOR, P.M., SAIT, M.** (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* 68:2391-2396.
- JOHNSON, D.B.** (1995) Mineral cycling by microorganisms, iron bacteria. S: 137-159, In Allsopp, D., Colwell, R.R., Hawksworth, D.L. (eds.) *Microbial diversity and ecosystem function*, CAB International, University Press, Cambridge, UK.
- JOHNSON, D.B.** (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:307-317.
- JOHNSON, D.B., BRIDGE, T.A.M.** (2002) Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *Appl. Microbiol. J.* 92:315-321.

- JOHNSON, D.B., GHOURI, M.A. MCGINNESS, S.** (1993) Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 11:63-70.
- JOHNSON, D.B., MCGINNESS, S.** (1991) Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:207-211.
- JOHNSON, D.B., ROLFE, S., HALLBERG, K.B., IVERSEN, E.** (2001) Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environm. Microbiol.* 3(10):630-637.
- JONES, J.G.** (1986) Iron transformation by freshwater bacteria. *Advances in Microbial Ecology* 9:149-185.
- JØRGENSEN, B.B.** (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296:643-645.
- KAEBERLEIN, T., LEWIS, K., EPSTEIN, S.S.** (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296:1127-1129.
- KAPFER, M.** (1998) Assessment of the colonization and primary production of microphytobenthos in the littoral of acidic mining lakes in Lusatia (Germany). *Water Air Soil Pollution* 108:331-340.
- KARANTHANASIS, A.D., THOMPSON, Y.L.** (1995) Mineralogy of iron precipitates in a constructed acid mine drainage wetland. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:1773-1781.
- KELLY, D.P., CHAMBERS, L.A., TRUDINGER, P.A.** (1969) Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal Chem* 41:889-901.
- KELLY, D.P., SHERGILL, J.K., LU, W.P., WOOD, A.P.** (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71:95-107.
- KISHIMOTO, N., KOSAKO, Y., TANO, T.** (1991) *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from an acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* 22:1-7.
- KÜSEL, K., DORSCH, T.** (2000) Effect of supplemental electron donors on the microbial reduction of Fe(III) and sulfate in coal mining-impacted freshwater lake sediments. *Microb. Ecol.* 40:238-249.
- KÜSEL, K., DORSCH, T., ACKER, G., STACKEBRANDT, E.** (1999) Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: Isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3633-3640.
- KÜSEL, K., ROTH, U., DRAKE, H.L.** (2002) Microbial reduction of Fe(III) in the presence of oxygen under low pH conditions. *Environ. Microbiol.* 4:414-421.
- KÜSEL, K., DRAKE, H.L.** (1995) Effects of Environmental Parameters on the Formation and Turnover of Acetate by Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3667-3675.
- LANDESUMWELTAMT BRANDENBURG** (1995) Wasserbeschaffenheit in Tagebaurestseen – Studien und Tagungsberichte Band 6. Potsdam.

- LASKOV, C., AMELUNG, W., PEIFFER, S.** (2002) Organic Matter Preservation in the Sediment of an Acidic Mining Lake. *Environ. Sci. Technol.* 36:4218-4221.
- LAUBAG (LAUSITZER BRAUNKOHLE AKTIENGESellschaft)** (1995) Das schwarze Gold der Lausitz. Senftenberg.
- LEE, D.-H., ZU, Y.-G., KIM, S.-J.** (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3112-3120.
- LIESACK, W., BAK, F., KREFT, J.U., STACKEBRANDT, E.** (1994) *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 162:85-90.
- LIESACK, W., JANSSEN, P.H., RAINEY, F.A., WARD-RAINEY, N.L., STACKEBRANDT, E.** (1997) Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. S. 375-439. In: *Modern Soil Microbiology*. Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Hrsg.). Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- LINDSAY, W.L., SCHWAB, A.P.** (1982) The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant. Nutr.* 5:1531-1536.
- LIU, C., KOTA, S., ZACHARA, J.M., FREDRICKSON, J.K., BRINKMANN, C.K.** (2001) Kinetic Analysis of the Bacterial Reduction of Goethite. *Environ. Sci. Technol.* 36:4218-4221.
- LIU, W.T., HUANG, C.L., HU, J.Y., SOON, L.F., ONG, S.L., NG, W.J.** (2002) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Polymorphism for Rapid 16S rDNA Clone Screening and Microbial Diversity Estimation. *J. Biosci. & Bioeng.* 93:101-103.
- LIU, W.T., MARSH, T.L., CHENG, H., FORNEY, L.J.** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- LLOBET-BROSSA, E., ROSSELLO-MORA, R., AMANN, R.** (1998) Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 64:2691-2696.
- LONERGAN, D.J., JENTER, H.L., COATES, J.D., PHILLIPS, E.J.P., SCHMIDT, T.M., LOVLEY, D.R.** (1996) Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 178:2402-2408.
- LÓPEZ-ARCHILLA, A.I., MARÍN, I., AMILS, R.** (2001) Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microb. Ecol.* 41:20-35.
- LOVLEY, D.R.** (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:263-290.
- LOVLEY, D.R.** (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:305-313.
- LOVLEY, D.R.** (2000) Fe(III) and Mn(IV) reduction. In *Environmental metal-microbe interactions*, Lovley, D. R., Eds.; Washington, DC: ASM Press. , pp 3-30.

- LOVLEY, D.R., COATES, J.D.** (2000) Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Current Opinion in Microbiology* 3:252-256.
- LOVLEY, D.R., PHILLIPS, E.J.P.** (1986A) Organic matter mineralisation with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Env, Microbiol.* 51:683-689.
- LOVLEY, D.R., PHILLIPS, E.J.P.** (1986B) Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:751-757.
- LOVLEY, D.R., PHILLIPS, E.J.P., LONERGAN, D.J.** (1991) Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. *Environ. Sci. Technol.* 25:1062-1067.
- LOWE, K.L., DICHRISTINA, T.J., ROYCHOUDHURY, A.N., VAN CAPPELLEN, P.** (2000) Microbiological and geochemical characterization of microbial Fe(III) reduction in salt marsh sediments. *Geomicrobiol. J.* 17:163-178.
- LOY, A., KÜSEL, K., LEHNER, A., DRAKE, H.L., WAGNER, M.** (2003) Diversity of Sulfate-Reducing Prokaryotes in an Acidic Fen: Comparison of 16S rRNA Gene-Based Oligonucleotide Microarray Hybridisation with Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Gene Surveys. *Appl. Environ. Microbiol.*
- LOY, A., LEHNER, A., LEE, N., ADAMCZYK, J., MEIER, H., ERNST, J., SCHLEIFER, WAGNER, M.** (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5064-5081.
- LUDWIG, W., BAUER, S.H., BAUER, M., HELD, I., KIRCHHOF, G., SCHULZE, R., HUBERT, I., SPRING, S., HARTMANN, A., SCHLEIFER, K.-H.** (1997) Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:181-190.
- LUEDERS, T., FRIEDRICH, M.** (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2732-2742.
- LUTHER, III, G.W.** (1991) Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55:2839-2849.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J.** (2000) Brock biology of microorganisms. 9. Aufl., Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- MATIN, A.** (1990) Keeping a neutral cytoplasm: the bioenergetics of obligate acidophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:307-318.
- MCINERNEY, M.J., BRYANT, M.P.** (1981) Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis: In: Sofer, S.S., Zaborsky, O.R. (Hrsg.) *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*, Plenum, New York, S. 277-296.
- MEIER, J., BABENZIEN, H.-D.** (2000) Acid mining lakes: Diversity of bacteria involved in sulfur cycling, Annual Report 1999, Berichte des IGB, S. 79-90.
- MILLER, D.N.; BRYANT, J.E.; MADSEN, E.L.; GHIOSE, W.C.** (1999) Evaluation and Optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4715-4724.

- MILLER, G.C., LYONS, W.B., DAVIS, A.** (1996) Understanding the water quality of pit lakes. *Environ. Sci. Technol.* 30(3):118A-123A.
- MILLS, A.L., BELL, P.E., HERLIHY, A.T.** (1989) Microbes, sediments, and acidified water; the importance of biological buffering. In: Rao, S.S. (Hrsg.) *Acid stress and aquatic microbial interactions*. CRC Press, Boca Raton: S. 1-19.
- MORÉ, M.I.; HERRICK, J.B.; SILVA, M.C.; GHIOSE, W.C.; MADSEN, E.L.** (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1572-1580.
- MÜLLER, H.J.** (1984) *Ökologie*. UTB, Gustav Fischer, Jena. S. 25.
- MUNCH, J.C., OTTOW, J.C.G.** (1980) Preferential reduction of amorphous to crystalline iron oxides by bacterial activity. *Soil Sci.* 129:15-21.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G.** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- MUYZER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE, A., WAVER, C.** (1995) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L., Van Elsas,
- NEALSON, K.H., MYERS, C.R.** (1992) Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:439-443.
- NIXDORF, B., HEMM, M.** (2000) Besonderheiten im Stoffhaushalt künstlicher Klarwasserseen Südostbrandenburgs (Tagebauseen der Lausitz) - ein Überblick. *Gewässerökologie Norddeutschlands* 2000/4:32-39.
- NIXDORF, B., WOLLMANN, K., DENEKE, R.** (1998) Ecological potentials for planktonic development and food web interactions in extremely acidic mining lakes in Lusatia. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) *Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation*. *Environ. Sci. Series* Springer, Berlin: S. 147-167.
- NOHLEN, C.** (1999) Differenzierung der partikulären organischen Substanz hinsichtlich ihrer Herkunft in sauren Restlochseen des Braunkohletagebaus der Lausitz. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- NÜBEL, T., KLUGHAMMER, C., HUBER, R., HAUSKA, G. UND SCHÜTZ, M.** (2000) Sulfide-quinone reductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* VF5. *Arch. Microbiol.* 173:233-244.
- O'FLAHERTY, V., MAHONY, T., O'KENNEDY, R., COLLERAN, E.** (1998) Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulfate-reducing bacteria. *Process Biochem.* 33:555-596.
- OLSEN, G.J., LANE, S.J., GIOVANNONI, S.J., PACE, N.R.** (1986) Microbial Ecology and Evolution: A ribosomal RNA Approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:337-365.
- PACKROFF, G., BLASCHKE, W., HERZSPRUNG, P., MEIER, J., SCHIMMELE, M., WOLLMANN, K.** (2000) Limnologie und Gewässerchemie von ausgewählten, geogen schwefelsauren

- Tagebaurestseen der Niederlausitz. In: Wiegand, G., Bröring, U., Mrzljak, J. & Schulz, F. (Hrsg.) Naturschutz in Bergbaufolgelandschaften. Physica, Heidelberg. S. 314-330.
- PALLERONI, N.J.** (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72:3-19.
- PARRINO, V., KRAUS, D.W. UND DOELLER, J.E.** (2000) ATP Production from the oxidation of sulfide in gill mitochondria of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *J. Exp. Biol.* 203:2209-2218
- PÄTZ, H., RASCHER, J., SEIFERT, A.** (1989) Kohle – ein Kapitel aus dem Tagebuch der Erde. Teubner, Leipzig: S. 150f.
- PECK JR., D.P.** (1993) Bioenergetic strategies of the sulfate-reducing bacteria. In: Odom, J.M. und Singleton Jr., R. (Hrsg.) The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. Springer, New York Inc.: S. 41-76.
- PEIFFER, S.** (1994) Reaction of H₂S with Ferric Oxides. - *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*, 11:371-390.
- PEINE, A.** (1998) Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth. - Saure Restseen des Braunkohletagebaus - Charakterisierung und Quantifizierung biogeochemischer Prozesse und Abschätzung ihrer Bedeutung für die seeinterne Neutralisierung,, Bayreuth.
- PEINE, A., PEIFFER, S.** (1998) In-lake neutralization of acid mining lakes. In: Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (Hrsg.) Acid mining lakes - acid mine drainage, limnology and reclamation. *Environ. Sci. Series Springer*, Berlin: S. 47-63.
- PEINE, A., TRITSCHLER, A., KÜSEL, K., PEIFFER, S.** (2000) Electron flow in an iron-rich acidic sediment - evidence for an acidity-driven iron cycle. *Limnol. Oceanogr.* 45:1077-1087.
- PETRASCHECK, W.E.** (1956) Kohle. Springer, Berlin: S. 104f.
- PETRIE, L., NORTH, N.N., DOLLHOPF, S.L., BLAKWILL, D.L., KOSTKA, J.E.** (2003) Enumeration and Characterization of Iron(III)-Reducing Microbial Communities from Acidic Subsurface Sediments Contaminated with Uranium(VI). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7467-7479
- PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X.; SIMONET, P.** (1992) Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2717-2722.
- PRECHT, M.** (1982) Biostatistik. Teil 1, 3. Auflage. R. Oldenbourg Verlag, München
- PRONK, J.T., DE BRUYN, J.C., BOS, P., KUENEN, J.G.** (1992) Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2227-2230.
- PRONK, J.T., JOHNSON, D.B.** (1992) Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicrobiol. J.* 10:153-171.
- RATH, J., WU, K.Y., HERNDL, G.J., DELONG, E.F.** (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat. Microb. Ecol.* 14:261-269.

- RAVENSCHLAG, K., SAHM, K., AMANN, R.** (2001) Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* 67:387-395.
- RAVENSCHLAG, K., SAHM, K., PERNTHALER, J., AMANN, R.** (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3982-3989.
- REGENSPURG, S.** (2002) Charakterisierung von Schwertmannit – Geochemische Wechselwirkungen mit Arsenat und Chromat und Bedeutung in Sedimenten von Restseen des Braunkohletagebaus. Dissertation, Universität Bayreuth.
- REIS, M.A.M., ALMEIDA, J.S., LEMOS, P.C., CARRONDO, M.J.T.** (1992) Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 40:593-600.
- RODEN, E.R., URRUTIA, M.M.** (1999) Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environ. Sci. Technol.* 33:1847-1853.
- RODEN, E.R., URRUTIA, M.M., CARROLL J.M.** (2000) Bacterial Reductive Dissolution of Crystalline Fe(III) Oxide in Continuous-Flow Column Reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1062-1065.
- RODEN, E.R., WETZEL, R.G.** (1996) Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnol. Oceanograph.* 41:1733-1748.
- RODEN, E.R., ZACHARA, J.M.** (1996) Microbial Reduction of Crystalline Iron(III) Oxides: Influence of Oxide Surface Area and Potential for Cell Growth. *Environ. Sci. Technol.* 30:1618-1628.
- ROONEY-VARGA, J.N., SHARAK GENTHNER, B.R., DEVEREUX, R., WILLIS, S.G., FRIEDMAN, S.D., HINES, M.E.** (1998) Phylogenetic and physiological diversity of sulphate-reducing bacteria isolated from salt marsh sediment. *System. Appl. Microbiol.* 21:557-568.
- ROTH, U.** (2000) Reduktion von Fe(III) durch heterotrophe und autotrophe Mikroorganismen in sauren Sedimenten von Braunkohlerestseen. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.
- RUMPEL, C., KÖGEL-KNABNER, I.** (2002) Characterisation of organic matter and carbon cycling in rehabilitated lignite-rich mine soils. *Water, Air & Soil Pollution* 3:153-166.
- SAHM, K., BERNINGER, U.-G.** (1998) Abundance, vertical distribution, and community structure of benthic prokaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 165:71-80.
- SAND, W., GEHRKE, T., JOZSA, P.-G., SCHIPPERS, A.** (2001) (Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59:150-175.
- SAND, W., RHODE, K., SOBOTKE, B., ZENNECK, C.** (1992) Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:85-92.
- SANDERS, H.L.** (1968) Marine benthic diversity: a comparative study. *Am. Natur.* 102:243-282.

- SASS, H., WIERINGA, E., CYPIONKA, H., BABENZIEN, H.-D., OVERMANN, J.** (1998) High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Arch. Microbiol.* 170:243-251.
- SCHÄFER, M.** (2003) Wörterbuch der Ökologie. 4.Auflage, Spektrum, Heidelberg
- SCHINK, B., PHILIPP, B., MÜLLER, J.** (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 87:12-23.
- SCHMITT, M.** (1994) Wie sich das Leben entwickelte – Die faszinierende Geschichte der Evolution. Mosaik-Verlag München.
- SCHRENK, M.O., EDWARDS, K.J., GOODMAN, R.M., HAMERS, R.J., BANFIELD, J.F.** (1998) Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acidic mine drainage. *Science* 279:1519–1522.
- SHAYMUKHMETOV, M.S. TITOVA, N.A., TRAVNIKOVA, L.S., LABENETS, Y.M.** (1985) Use of physical fractionation methods to characterize soil organic matter. *Soviet Soil Sci.* 16:117-128.
- SHERIDAN, P.P., MITEVA, V.I., BRENCHELEY, J.E.** (2003) Phylogenetic Analysis of Anaerobic Psychrophilic Enrichment Cultures Obtained from a Greenland Glacier Ice Core. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2153-2160
- SIMBERLOFF, D.S.** (1972) Properties of the rarefaction diversity measurement. *Am. Natur.* 106:414-418.
- SINGER, P.C., STUMM, W.** (1970) Acid mine drainage: the rate-determining step. *Science* 167:1121-1123.
- SINGH, B., HARRIS, P.J., WILSON, M.J.** (1997) Geochemistry of acid mine waters and the role of micro-organisms in such environments: A review. *Advances in GeoEcology* 30:159-192.
- SINGLETON, D.R., FURLONG, M.A., RATHBUN, S.L., WHITMAN, W.B.** (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4374-4376.
- SIZOVA, M.V., PANIKOV, N.S., TOUROVA, T.P., FLANAGAN, P.W.** (2003) Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from *Sphagnum* peat bog. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:301-315.
- SNOEYENBOS-WEST, O.L., NEVIN, K.P., ANDERSON, R.T., LOVLEY, D.R.** (2000) Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments. *Microb. Ecol.* 39:153-167.
- SØRENSEN, J.** (1982) Reduction of ferric iron in anaerobic, marine sediment and interaction with reduction of nitrate and sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:319-324.
- STALEY, J. T.** (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Williams and Wilkins: Baltimore.
- STRAUB, K.L., BENZ, M., SCHINK, B.** (2001) Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:181-186.

- STRUNK, O., GROSS, O., REICHEL, B., MAY, M., HERMANN, S., STRUCKMANN, N., NONHOFF, M., LENKE, M., VILBIG, A., LUDWIG, T., BODE, A., SCHLEIFER, K.-H., LUDWIG, W.** (1998) ARB: a software environment for sequence data.
- STUMM W., MORGAN, J.** (1996) Aquatic Chemistry. Wiley, New York, S. 1022.
- SUZUKI, M.T., GIOVANNONI, S.J.** (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62:625-630.
- TABATABAI, M.A.** (1974) Determination of sulfate in water samples. Sulfur Inst. J. 10:11-13.
- TAMURA H., GOTO K., YOTSUYANAGI T., NAGAYAM, M.** (1974) Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-Phenanthroline in the presence of large amounts of iron (III). Talanta 21:314-318.
- TEBO, B.M., OBRAZTSOVA, A.Y.** (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. FEMS Microbiol. Lett. 162:193-198.
- THAMDRUP, B., FINSTER, K., HANSEN, J.W., BAK, F.** (1993) Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. AEM 59:101-108.
- THIENEMANN, A.** (1920) Die Grundlagen der Biocoenotik und Monards faunistische Prinzipien. - Festschrift für Zschokke (Basel), Nr. 4:1-14.
- TORSVIK, V., OVREAS, L., THINGSTAD, T.F.** (2002) Prokaryotic diversity- magnitude, dynamics, and controlling factors. Science 296:1064-1066.
- TRITSCHLER, A.** (1998) Charakterisierung von Eisenmineralen in Sedimenten saurer Restseen der ehemaligen Tagebaue Grünwalde und Plessa (Lausitz). Diplomarbeit, Lehrstuhl für Hydrologie, Limnologische Station, Universität Bayreuth.
- ULRICH, G.A., KRUMHOLZ, L.R., AND SUFLITA, J.M.** (1997) A rapid and simple method for estimating sulfate reduction activity and quantifying inorganic sulfides. Appl. Environment. Microbiol. 63:1627-1630.
- URAKAWA, H., KITA-TSUKAMOTA, K., OHWADA, K.** (1999) Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. Microbiology 145:3305-3315.
- URRUTIA, M.M., RODEN, E.E., FRERICKSON, J.K., ZACHARA, J.M.** (1998) Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella alga*. Geomicrobiol. 15:269-291.
- VAN STEENIS C.G.G.J.** (1957) Specific and infraspecific delimitation. Flora Malesiana. 5:167-234.
- VILE, M.A., WIEDER, R.K.** (1993) Alkalinity generation by Fe(III) reduction versus sulfate reduction in wetlands constructed for acid mine drainage treatment. Water Air Soil Pollution 69:425-441.
- VON WINTZINGERODE, F., GÖBEL, U.B., STACKEBRANDT, E.** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21:213-229.

- WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHLEIFER, K.H.** (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 59:1520-1525.
- WALLRABENSTEIN, C., HAUSCHILD, E., SCHINK, B.** (1994) Pure culture and cytological properties of *Syntrophobacter wolinii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:249-254.
- WASCHKIES, C., HÜTTL, R.F.** (1999) Microbial degradation of geogenic C and N in mine spoils. *Plant Soil* 213:221-230.
- WELLSBURY, P., HERBERT, R.A., PARKES, R.J.** (1996) Bacterial activity and production in near-surface estuarine and freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19:203-214.
- WENDT-POTTHOFF, K., MEIER, J.** (2000) Mikrobiologie von Tagebaurestseen in der Lausitz. In: Friese, K., Von Tümpling, W. (Hrsg.) *Biologische und chemische Entwicklung von Bergbaurestseen*. UFZ-Bericht 26/2000: S. 183-198.
- WIDDEL, F., BAK, F.** (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin: S. 3352-3389.
- WILLMANN, G., FAKOUSSA, R.M.** (1997) Biological bleaching of water soluble coal macromolecules by a basidiomycete strain. *Appl. Microbio. Biotech.* 47:95-101.
- WOESE, C.R.** (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-272.
- WOESE, C.R., KANDLER, O., WHEELIS, M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4576-4579.
- WOLLMANN, K., DENEKE, R., NIXDORF, B., PACKROFF, G.** (2000) Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2-4). *Hydrobiologia* 433:3-14.
- WULF-DURAND, P., BRYANT, L.J., SLY, L.I.** (1997) PCR-mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2944-2948.
- YAO, W., MILLERO, F.J.** (1996) Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Mar. Chem.* 52:1-16.
- ZENGLER, K., TOLEDO, G., RAPPE, M., ELKINS, J., MATHUR, E.J., SHORT, J.M., KELLER, M.** (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15681-15686.
- ZHOU, J., BRUNS, M.A., TIEDJE, J.M.** (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316-322.

6 Anhang

6.1 Dichtefraktionierung

Durch eine Dichtefraktionierung können in Böden und Sedimenten gering zersetzte organische Substanz und organo-mineralische Komplexe von der Mineralfraktion getrennt werden. Die Trennung erfolgt über eine Dichtefraktionierung nach unterschiedlichen Dichtebereichen. Die wichtigsten Dichtebereiche für Böden, welche für Charakterisierung der organischen Substanz in Sedimente bisher selten eingesetzt wurde (HEDGES UND OADES, 1997), sind nach SHAYMUKHAMETOV ET AL (1985) und CHRISTENSEN (1992):

Leichte Fraktion ($<2,0 \text{ g cm}^{-3}$): Diese Fraktion setzt sich aus gering zersetzter organischer Substanz in freier partikulärer Form zusammen.

Mittlere Fraktion ($2,0\text{-}2,4 \text{ g cm}^{-3}$): Diese Fraktion enthält organo-mineralische Komplexe

Schwere Fraktion ($>2,4 \text{ g cm}^{-3}$): Diese Fraktion ist praktisch frei von organischer Substanz.

6.2 Analyse der Huminstoff-Lösungen

Die Analyse der Huminstoffe erfolgte über das LC-OCD-Verfahren (LC-OCD = Liquid Chromatography - Organic Carbon Detection). Es handelt sich dabei um ein Chromatographie-System, das neben einem UV-Detektor auch einen Kohlenstoff-selektiven Detektor (OCD) enthält. Die chromatographische Auftrennung des TOC-Stoffgemischs vollzieht sich über eine Trennsäulen mit porösem Gelen, wobei die unterschiedlichen Substanzklassen primär nach ihrer Molekülgröße getrennt werden. Große Moleküle eluieren hierbei schneller als kleine, da diese weniger tief in das Gel eindringen können. Neben diesem primärem Trennprinzip treten noch Sekundäreffekte auf. Bei diesen handelt es sich um hydrophobe und ionogene Wechselwirkungen. Eine Überlagerung dieser Trennprinzipien machte eine noch bessere Charakterisierung der Substanzklassen möglich.

Nachfolgend eine kurze Beschreibung der mit diesem System erhaltenen chromatographischen Fraktionen:

6.2.1 Fraktion 1: Huminstoffe (HS)

Huminstoffe bilden mengenmäßig die häufigste organische Substanzklasse der Erde. Trotzdem ist ihre Entstehung noch immer nicht geklärt. Sowohl aggradative Wege (Polymerisation), als auch degradative Wege (Hydrolyse, Oxidation) sind möglich. Eine Internationale Gesellschaft (IHSS) beschäftigt sich u.A. mit dieser Frage. Für den

aquatischen Bereich gilt als wahrscheinlich, dass die Bildung der Huminstoffe einhergeht mit dem Absterben von Bakterien. Huminstoffe werden operationell in die nachfolgend aufgeführten Klassen unterteilt, wobei der Übergang der einzelnen Verbindungsgruppen in Wirklichkeit fließend ist:

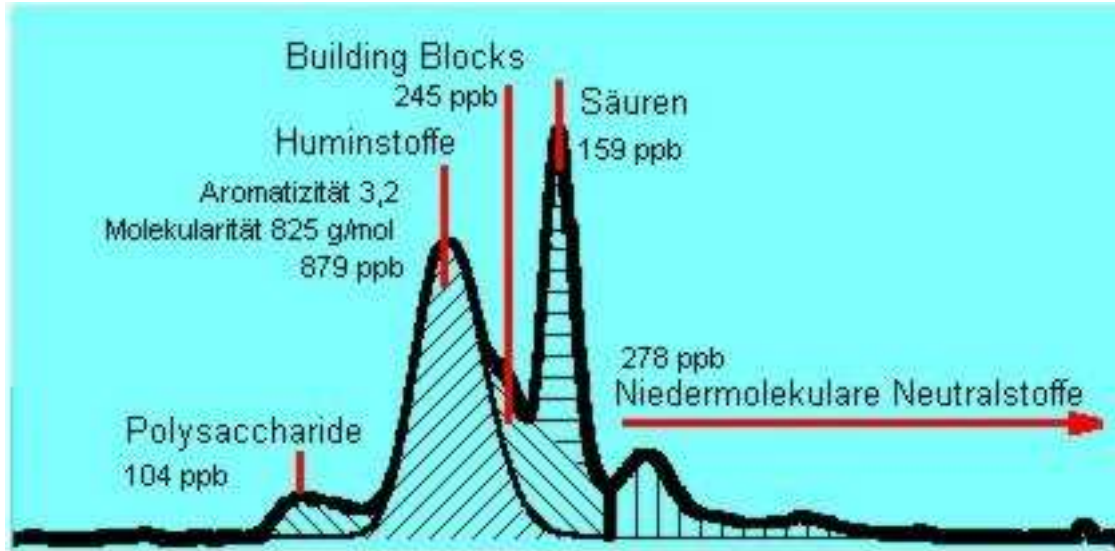


Abbildung 6.1 Das Bild zeigt das Chromatogramm eines typischen Oberflächenwassers.

Humine (H) entstehen bei der Humusbildung im Oberboden. Diese weisen ein hohes molekulares Gewicht auf (10.000 - X mio g/mol), besitzen einen polyaromatischen Kern und sind kaum wasser- oder laugenlöslich.

Huminsäuren (HA) sind Intermediäre, die bei der Bildung von Humus oder beim Abbau von Humus entstehen. Sie enthalten weniger aromatische Ringe und mehr sauerstoffhaltige Substituenten als die Humine. Die Molmasse dieser Verbindungen liegt im Bereich zwischen 1.000 und 10.000 g/mol. Huminsäuren sind im Sauren unlöslich ($\text{pH} < 2$), aber bereits gut löslich im Alkalischen.

Fulvinsäuren (FA) können im Wasser gebildet werden (autochtone Bildung), oder aber sind niedermolekulare Endglieder von Huminsäuren aus Bödenauswaschungen. Sie besitzen noch weniger (hochsubstituierte) Ringe, vielleicht sogar nur noch aus Ringspaltung entstandene konjugierte Systeme. Sie enthalten einen hohen Anteil an säurefunktionellen Gruppen, wobei die Unterteilung in Kern- und Hüllbereiche verwischt ist. Die Molmassen liegen zwischen 600-1.000 g/mol. FA sind gut löslich sowohl im Alkalischen als auch im Sauren. In natürlichen Wässern kommen fast nur FA vor. Ihr Anteil am TOC liegt meist zwischen 50-80 %.

6.2.2 Fraktion 2: HS-Hydrolysate (Building Blocks)

Nachweis mit LC-OCD: Die FA-Signale in den LC-OCD Chromatogrammen sind in vielen Fällen von kleineren Schultern überlagert. Die Form und UV-Absorption der Schultern sind variabel. Aus FA können sie erzeugt werden durch Bestrahlung mit UV-Licht, oder bereits durch Ultraschallbehandlung. Wahrscheinlich sind die HS-Hydrolysate die Endglieder des HS-Kontinuums, also Oxidations- bzw. Hydrolyseprodukte aus HS. Ein weiterer Abbau, z.B. durch Oxidation, führt zur Bildung freier Carbonsäuren. Der Mengenanteil der HS-Hydrolysate in natürlichen Wässern liegt bei 10-20 %.

6.2.3 Fraktion 3: Niedermolekulare Säuren

Niedermolekulare Säuren sind stets weit fortgeschrittene Oxidationsprodukte aus dem Abbau von TOC. Biologisch werden sie sehr rasch weiteroxidiert, in biologisch ausgezehrten Wässern wie Grundwässern sind sie meist nicht nachweisbar. Die Konzentrationen in Oberflächenwässern können dagegen sehr variabel sein, da Säuren sowohl abgebaut werden, als auch als Zwischenprodukte neu gebildet werden.

6.2.4 Fraktion 4: Neutral-amphiphile Fraktion

Die Funktion dieser Fraktion, die in allen natürlichen Wässern deutlich vorhanden ist (10-30 % vom TOC) und daher schwer abbaubar sein muss, ist noch wenig verstanden. Es könnten "verzweigte" und daher schwer abbaubare Zwischenprodukte des mikrobiellen Abbaus sein, oder Vorstufen der Huminstoffbildung.

6.2.5 Fraktion 5: Polysaccharide (EPS = Extrazelluläre polymere Substanz)

Es liegen im Wesentlichen Zellwandmaterial und Stoffwechselprodukte von Algen (sehr gut abbaubar, geringe Uronsäuregehalte) und Bakterien vor (schlechter abbaubar, höhere Uronsäuregehalte). Der Begriff "Polysaccharide" ist als Sammelbegriff zu verstehen, er schließt auch Aminosucker, Zuckersäuren und saure Proteine ein. Die Polysaccharid-Fraktion ist eine Indikatorfraktion für Oberflächengewässer. Ihr Anteil am TOC liegt meist bei 5-25 %, wobei dieser stark abhängt von der Jahreszeit (z.B: Algenblüten). Ein ganz wesentlicher Eintragungspfad sind Kläranlagen. In Kläranlagenabläufen sind Polysaccharide die dominierende Fraktion.

6.2.6 Fraktion 6: Anorganische Kolloide

Diese Fraktion ist in TOC-Chromatogrammen nicht sichtbar, sie wird bei der mit dem LC-OCD Verfahren parallel durchgeführten UV-Detektion erfasst. Es liegen wahrscheinlich

hochmolekulare ($> X$ mio g/mol) anorganische Kolloide vor (Kieselsäure, Fe- und Al-Oxidhydrate).

6.2.7 Fraktion 7: Natürliche Hydrophobe Stoffe (HOC)

Der Vergleich des TOC-Summenwerts mit dem Gesamtintegral des Chromatogramms weist in der Regel eine Differenz aus, die auf organisches Material zurückzuführen ist, das an der Chromatographiesäule festgehalten wird und daher als hydrophob (HOC = Hydrophobic Organic Carbon) bezeichnet werden kann. Die Definition ist operationell, d.h. dass der Anteil des HOC am TOC durch die chromatographischen Bedingungen beeinflusst wird.

Die HOC-Anteile in natürlichen Wässern liegen zwischen "0" und 25 % am TOC. In Oberflächengewässern ist der HOC-Anteil meist höher. Zwei Entstehungswege sind bisher bekannt; A: In Oberflächenwässern: Lipide und Lipopolysaccharide von Bakterien und Algen; B: In Grundwässern schwerlösliche Humine, die aufgrund ihrer hohen Aromatizität deutlich hydrophob sind. Anthropogene Spurenstoffe (KW, CKW, PAK, Pflanzenschutzmittel) würden ebenfalls in die HOC-Fraktion fallen, sie sind mengenmäßig aber im Vergleich mit natürlichem HOC vernachlässigbar.

Tabelle 6.1 Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set Gb564/Gb1290.

OTU/	Länge [bp]	Zone	Nächste verwandte Sequenz	Ähnlichkeit [%]
<i>Acidobacterium</i>				
D-PCR-ZoneI-gGeo42	632	I	Klon WD247	97
D-PCR-ZoneI-gGeo22	680	I	Isolat Ellin310	96
D-PCR-ZoneI-gGeo23	710	I	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	97
D-PCR-ZoneI-GZI2	695	I	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	97
D-PCR-ZoneI-GZI38	691	I	Klon UA2	96
D-PCR-ZoneI-GZI19	736	I	Klon RCP1-43	97
D-PCR-ZoneI-GZI25	716	I	Klon RB04	89
D-PCR-ZoneI-GZI27	435	I	Klon RCP2-3	97
D-PCR-ZoneI-gGeo41	610	I	Klon RCP2-4	99
D-PCR-ZoneIII-GZIII13	740	III	Klon RCP1-43	97
D-PCR-ZoneIII-GZIII36	740	III	Klon RCP1-43	97
D-PCR-ZoneIII-GZIII38	740	III	Klon RCP1-43	97
D-PCR-ZoneIII-GZIII55	738	III	Klon RCP1-43	92
D-PCR-ZoneIII-Geo8	565	III	Klon RCP1-43	97
D-PCR-ZoneIII-GZIII5	720	III	Klon RCP1-43	98
D-PCR-ZoneIII-GZIII16	694	III	Isolat Ellin310	90

D-PCR-ZoneIII-gGeo33	580	III	Klon RCP2-4	99
D-PCR-ZoneIII-gGeo52	721	III	Klon RCP2-4	96
D-PCR-ZoneIII-gGeo54	708	III	Klon RCP2-4	99
D-PCR-ZoneIII-GZIII30	739	III	Klon UA2	98
D-PCR-ZoneIII-GZIII1	380	III	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	95
D-PCR-ZoneIII-GZIII24	741	III	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	94
D-PCR-ZoneIII-gGeo44	632	III	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	98

Actinomyceten (Acidomicrobium-Gruppe)

D-PCR-ZoneI-GZI4	740	I	Klon BA84	94
D-PCR-ZoneIII-Geo9	579	III	Klon TRA2-10	97
D-PCR-ZoneI-GZI35	683	I	Actinomyces spec. Isolat TM56	94
D-PCR-ZoneI-Geo4	553	I	Klon RCP1-33	98
D-PCR-ZoneI-gGeo17	351	I	Klon RCP1-33	98
D-PCR-ZoneI-gGeo38	595	I	Klon BA84	95
D-PCR-ZoneIII-gGeo47	601	III	Klon FW43	92
D-PCR-ZoneIII-gGeo48	642	III	Klon BA84	98
D-PCR-ZoneIII-gGeo53	621	III	Klon BA84	96

Spirocheta

D-PCR-ZoneI-Geo26	586	I	<i>Spirochaeta</i> sp.	96
D-PCR-ZoneI-Geo32	708	I	Klon FW67	96

Unknown

D-PCR-ZoneI-Geo21	575	I	Klon FW13	99
D-PCR-ZoneI-Geo36	656	I	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneIII-Geo37	667	III	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneIII-Geo7	552	III	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneI-gGeo25	650	I	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneI-gGeo27	655	I	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneIII-gGeo43	621	III	Klon RA13C7	87
D-PCR-ZoneIII-gGeo46	721	III	Klon RA13C7	87

Nitrospira

D-PCR-ZoneI-Geo21	575	I	Klon FW13	99
D-PCR-ZoneIII-Geo5	197	III	Klon FW13	99

γ -Proteobacteria

D-PCR-ZoneIII-gGeo49	684	III	Klon RCP1-10	95
D-PCR-ZoneIII-gGeo51	665	III	Klon RCP1-57	96
D-PCR-ZoneIII-Geo6	587	III	<i>Shewanella alga</i>	93

δ -Proteobacteria

D-PCR-ZoneIII-GZIII54	521	III	<i>Geobacter</i> sp.	97
-----------------------	-----	-----	----------------------	----

Tabelle 6.2 Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set GM3/Geo825R.

OTU/	Länge [bp]	Zone	Nächste verwandte Sequenz	Ähnlichkeit [%]
δ-Proteobacteria				
D-PCR-ZoneIII-Geo1	616	III	<i>Geobacter grbicum</i> TACP-5	90
D-PCR-ZoneIII-Geo22	305	III	<i>Geobacter</i> sp. CdA-2	93
D-PCR-ZoneIII-Geo23	657	III	<i>Geobacter</i> sp. CdA-2	96
D-PCR-ZoneIII-Geo17	609	III	<i>Geobacter</i> sp. CdA-2	97
Acidobacteria				
D-PCR-ZoneIII-Geo3	559	III	Klon kb2426	92
D-PCR-ZoneIII-15GM3	810	III	Klon WD247	96
Caldothrix				
D-PCR-ZoneIII-Geo4	659	III	Uncultured eubacterium	90
Actinomycetes				
D-PCR-ZoneIII-Geo10	694	III	Klon FW43	91
Nitrospira / Magnetobacterium				
D-PCR-ZoneIII-Geo11	650	III	Klon 36-11	89
Syntrophobacteria				
D-PCR-ZoneIII-Geo20	477	III	Klon GOUTA19	93
D-PCR-ZoneIII-Geo2	633	III	<i>Syntrophobacter wolinii</i>	91
D-PCR-ZoneIII-Geo6	639	III	Bakterium K-4b1	93
D-PCR-ZoneIII-Geo7	611	III	Klon SJA-172	94
D-PCR-ZoneIII-Geo26	647	III	Bakterium K-4b1	94
D-PCR-ZoneIII-Geo27	616	III	Klon SJA-172	95
D-PCR-ZoneIII-Geo28	634	III	Klon SJA-172	94
D-PCR-ZoneIII-Geo30	573	III	Bakterium K-4b1	93
D-PCR-ZoneIII-Geo31	562	III	Bakterium K-4b1	96
D-PCR-ZoneIII-26GM3	787	III	Bakterium K-4b1	94
D-PCR-ZoneIII-28GM3	800	III	Bakterium K-4b1	93
D-PCR-ZoneIII-34GM3	725	III	Bakterium K-4b1	92
D-PCR-ZoneIII-39GM3	700	III	Bakterium K-4b1	93
D-PCR-ZoneIII-45GM3	805	III	Bakterium K-4b1	94
Desulfobacterium				
D-PCR-ZoneIII-Geo25	583	III	Klon LA30-B27	91
D-PCR-ZoneIII-Geo16	262	III	Klon GCA017	93
Desulfomonile				
D-PCR-ZoneIII-41GM3	800	III	<i>Desulfomonile limimaris</i>	91
D-PCR-ZoneIII-33GM3	767	III	Klon Btol	93
D-PCR-ZoneIII-46GM3	808	III	Klon Btol	94
D-PCR-ZoneIII-47GM3	740	III	Klon Btol	94
D-PCR-ZoneIII-24GM3	796	III	<i>Angiococcus disciformis</i>	89
γ-Proteobacteria				

D-PCR-ZoneIII-14GM3	703	III	Klon RCP1-10	95
D-PCR-ZoneIII-17GM3	759	III	Klon RCP1-10	95
D-PCR-ZoneIII-11GM3	780	III	Klon RCP1-57	98

Tabelle 6.3 Zusammenfassung der erhaltenen 16S rDNA Klone aus den Zone I, II und III und der nächste Verwandte aus der Embl-Genbank mit dem Primer-Set (Acido594F/Acido1150R), (Gx182F/Gx472R), Shw783F/Shw1245R) und (Ferro458F/Ferro1473R).

OTU/		Länge [bp]	Zone	Nächste verwandte Sequenz	Ähnlichkeit [%]
<i>Acidophilium</i>					
D-PCR-ZoneI/III-Acido3		559	I + III	<i>Acidiphilium</i> sp. NO-17	99
D-PCR-ZoneI/III-Acido22		559	I + III	<i>Acidiphilium</i> sp. NO-17	99
D-PCR-ZoneI/III-Acido24		559	I + III	<i>Acidiphilium angustum</i>	99
D-PCR-ZoneI/III-Acido30		559	I + III	<i>Acidiphilium</i> sp. NO-17	99
D-PCR-ZoneIII-Acido23		559	III	<i>Acidiphilium</i> sp.	94
D-PCR-ZoneIII-Acido20		549	III	<i>Acidosphaera rubrifaciens</i>	94
D-PCR-ZoneIII-Acido31		559	III	<i>Acidisphaera</i> sp. NO-15	95
D-PCR-ZoneIII-Acido34		559	III	<i>Acidiphilium</i> sp.	95
<i>Geothrix</i>					
D-PCR-ZoneII-					
D-PCR-ZoneII-Geothrix20	1	173	II	Uncultured Holophaga sp.	97
D-PCR-ZoneII-Geothrix11	4	665	II	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	64
D-PCR-ZoneII-Geothrix14	1	513	II	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	61
D-PCR-ZoneII-Geothrix6	1	479	II	<i>Halobacterium salinarum</i>	56
D-PCR-ZoneII-Geothrix15	1	595	II	Klon FW67	96
D-PCR-ZoneII-Geothrix18	1	595	II	Klon WD247	95
<i>Shewanella</i>					
D-PCR-ZoneIII-Shw11	1	365	III	<i>Shewanella alga</i>	99
D-PCR-ZoneIII-Shw10	1	738	III	<i>Chromobacterium violaceum</i>	93
D-PCR-ZoneIII-Shw1	5	521	III	<i>Sterolibacterium denitrificans</i>	95
D-PCR-ZoneIII-Shw43	1	518	III	<i>Chromobacterium</i> sp.	89
Bioremediation-associated Bacteria					
D-PCR-ZoneI/III-Thio1	39	554	I + III	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	99

Tabelle 6.4 Ergebnisse der Huminstoff-Analyse

	DOC (Summe)	HOC	CDOC (Summe)	Poly- saccharide	Huminstoffe	Aromatizität (SAK/DOC)	Molmasse im Peak- maximum (Mp)	Neutral- stoffe + Amphiphile	Niedermole- kulare Säuren
	in mg/L	in mg/L % am DOC	in mg/L % am DOC	in mg/L % am CDOC	in mg/L % am CDOC	L/(mgxm)	g/mol--	in mg/L % am CDOC	in mg/L % am CDOC
MB_{HZIII} t₀	38,8	9,2 23,6	29,7 76,4	0,1 0,2	17,1 57,8	11,7	5235	12,4 41,9	0,0
MB_{HZIII} t_E	46,7	12,1 25,8	34,6 74,2	0,1 0,4	20,5 59,2	10,0	4845	12,1 35,0	1,9 5,4
MB_{HZIV} t₀	72,0	21,5 29,9	50,5 70,1	0,7 1,5	24,8 49,2	12,2	4758	24,9 49,4	0,0
MB_{HZIV} t_E	69,2	17,4 25,2	51,8 74,8	0,1 0,1	37,5 72,4	10,4	6082	14,2 27,5	0,0
Huminstoff-Lösung aus Zone I	161,0	11,9 7,4	149,0 92,6	2,2 1,4	17,7 12,0	8,7	4578	127,0 85,5	1,8 1,2
Huminstoff-Lösung aus Zone III	232,0	77,0 33,2	155,0 66,8	3,6 2,3	71,5 46,1	22,2	4945	78,0 50,2	2,1 1,4

Tabelle 6.5 Gärungsprodukte aus Glucose durch *A. capsulatum* und Wiederfindung der Elektronen im Fe(II) aus der Verbrauchten Glukose.

	Glukose- verbrauch [mM]	Acetat [mM]	Laktat [mM]	Succinat [mM]	Ethanol [mM]	Propionat [mM]	Butyrat [mM]	Glycerin [mM]	Iso- Butyrat [mM]	Elektronen im Fe(II) [mM]
Fe(OH)₃ - pH 3 ^{a)}	1,08	1,09	0	0,23	0	0	0	0	0	7,3
Fe(OH)₃ - pH 5	0,63	0,27	0,06 ^{b)}	0,12	0	0	0	0	0	13,9
Goethit - pH 3	0,93	0,57	0	0,11	0,09 ^{b)}	0	0	0	0	6,4
Goethit - pH 5 ^{c)}	0,87	0,27	0,07	0,12	0,31	0	0	0	0	6,7
FePP_i - pH 3	0,96	0,3	0,14 ^{b)}	0,23 ^{b)}	0,41	0	0,09	0,22	0,17	5,1
FePP_i - pH 5	1,04	1,02	0,07	0,24	0,34	0	0,13 ^{b)}	0,31 ^{b)}	0,14	20,6
FeCitrat - pH 3	1,7	0	0	0,09	0,23	0,09 ^{b)}	0	0,32 ^{b)}	0,21	7,7
FeCitrat - pH 5	1,82	0,2	0,2	0,11	0,19	0	0,24	0	0	47,4
Fe(III)₃(SO₄)₂	0,81	0,46	0	0	0,08	0	0	0	0	6,11

^{a)} bei t₀ konnte nur eine von drei Proben gemessen werden; ^{b)} wurde in einer von drei Proben gemessen; ^{c)} bei t₀ konnten nur zwei von drei Proben gemessen werden

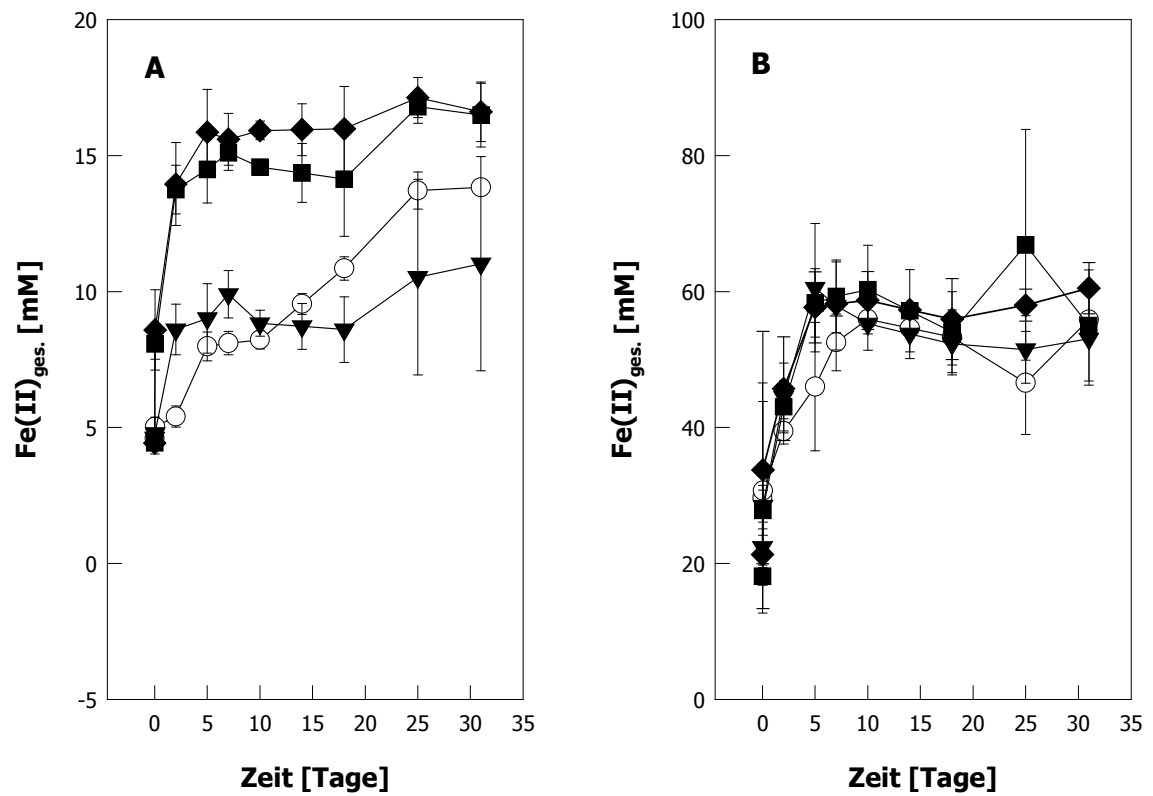


Abbildung 6.2 Einfluss von Na₂S (▲), Thiosulfat (■) und Tetrathionat (◆) auf Fe(II)_{ges.}-Freisetzung in Mikrokosmen der Zone I (A) und Zone III (B) bei 15°C. Als Kontrolle diente unbehandeltes Sediment (○). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus jeweils drei parallelen Ansätzen.

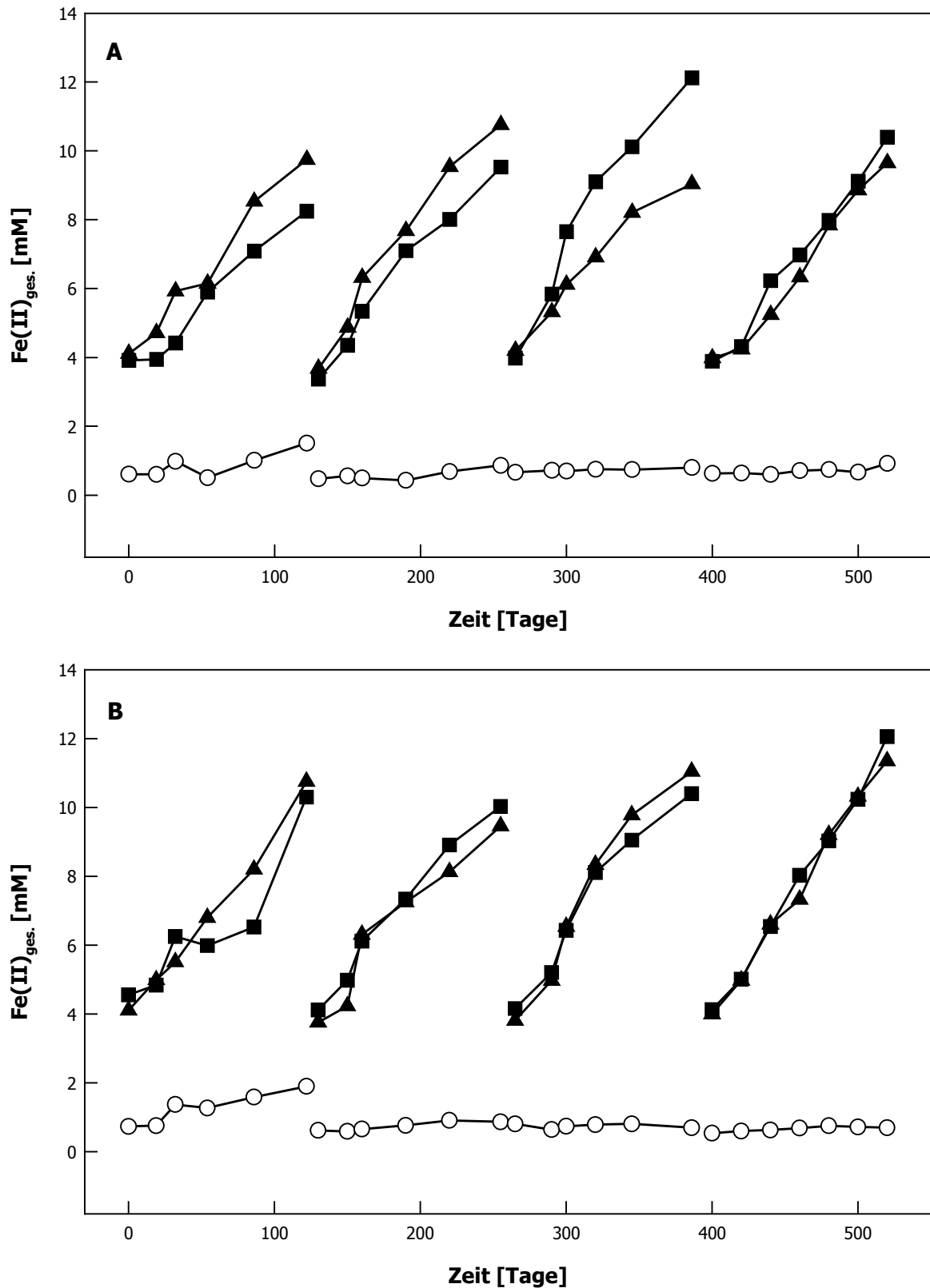


Abbildung 6.3 Fe(II)_{ges.}-Freisetzung aus Schwertmannit (40 mM) im Originaltransfer sowie den Folgetransfers 1-3 in den Anreicherungskulturen MB1 (▲) und MB2 (■) in Mineralmedium mit Na₂S (5 mM) als Elektronendonator bei 20°C und bei pH 3 (**A**) und pH 5 (**B**); chemische Kontrolle (○). Bei den dargestellten Messwerten handelt es sich um Einzelwerte.



Abbildung 6.4

Phylogenetische Analyse der erhaltenen Klonsequenzen aus allen molekularbiologischen Methoden. Für die Berechnung wurden nur solche Sequenzen verwendet, bei denen eine Alignment möglich war. Allgemeine Klonbibliothek (rot); DGGE-Klonbibliothek (grün); Klonbibliotheken aus der Verdünnungs-PCR (blau). Die Sequenzen wurden mit einem speziellen ARB-Tool in einen Distanz-Matrix-Baum hinzugefügt, ohne die Topologie des

Baumes zu verändern. Der eingezeichnete Balken ist ein Maß für eine 10%ige Sequenzabweichung.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den